



Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées : effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie

Vanessa Cohignac

► To cite this version:

Vanessa Cohignac. Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées : effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie. Pneumologie et système respiratoire. Université Paris-Est, 2015. Français. NNT : 2015PESC1185 . tel-01364910

HAL Id: tel-01364910

<https://theses.hal.science/tel-01364910>

Submitted on 13 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries
du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)**

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

présentée et soutenue publiquement par

Vanessa COHIGNAC

le 10 décembre 2015

**Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées :
effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie**

Directeur de thèse : **Sophie LANONE**

Co-directeur de thèse : **Jean-Claude PAIRON**

Jury

M. Romain GHERARDI, Professeur, Université Paris-Est

Mme. Maria Chiara MAIURI, Chargée de recherche, INSERM

Mme. Marie CARRIERE, Directrice de recherche, CEA

Mme. Sophie LANONE, Directrice de recherche, INSERM

M. Jean-Claude PAIRON, Professeur, Université Paris-Est

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse marque l'aboutissement de trois années enrichissantes de travail au cours desquelles j'ai rencontré de nombreuses personnes qui ont toutes contribué, de par leurs conseils ou leurs encouragements, à l'élaboration de ce travail, et que je tiens maintenant à remercier.

Tout d'abord, je remercie Marie Carrière, Maria Chiara Maiuri et Romain Gherardi d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'avoir pris de leur temps pour évaluer ce travail. Par la même occasion, je remercie les membres de mon comité de thèse Patrice Codogno et Jérôme Rose pour leurs précieux conseils et remarques qui auront permis de faire avancer la réflexion sur les résultats obtenus.

Je remercie le C'Nano Ile de France pour m'avoir financé lors de cette thèse. Je remercie également l'ANR Nanautophagie (ANR-13-CESA-0010-01) et le labex Sérénade (11-LABX-0064), qui ont financé une partie de ces travaux.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes deux directeurs de thèse Sophie Lanone et Jean-Claude Pairon pour avoir dirigé cette thèse, m'avoir guidée tout au long de celle-ci et pour m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce travail. Sophie, merci de m'avoir encadrée durant ces trois années, j'imagine que cela n'a pas été facile tous les jours avec mon « pessimisme légendaire ». Jean-Claude, merci pour tes remarques avisées et pour ta bonne humeur. Merci à vous deux pour la patience et l'efficacité dont vous avez fait preuve pour corriger les différentes versions de cette thèse.

Je remercie également Jorge Bockowski, pour m'avoir accueillie au sein de cette équipe, pour sa gentillesse et ses conseils. Je remercie Pascal Andujar pour sa sympathie et ses conseils lors des réunions nanos.

A tous les membres de l'équipe 4, un grand merci. Cela était très agréable de travailler en votre compagnie et j'ai pris plaisir à venir au laboratoire tous les jours. Je voudrais remercier Marie-Claude Bourin qui m'a permis d'entrer dans le monde de l'enseignement, Philippe Caramelle qui sait si bien animer les congrès (photos à l'appui) et Marie-Laure Franco-Montoya, la cuisinière officielle du labo à qui j'ai appris de nouveaux mots.

Je n'oublie évidemment pas les plus stylés, ceux avec qui j'ai passé le plus de temps et avec qui j'ai passé de très bons moments. Tout d'abord, les anciennes thésardes : Marion Landry, la bricoleuse du dimanche, qui m'aura appris les ficelles du métier dans la joie et la bonne humeur, et Sandra Chrusciel, la « plus pure du labo » d'après un certain test qui n'avait rien de scientifique (d'où mes doutes plus que fondés sur les résultats de ce test). Une pensée pour David Drummond, qui bien qu'être resté que peu de temps ici, m'aura fait bien rire (mention spéciale pour le fameux tiramisu). Merci aux deux Stéphane, appelés plus communément Stéphane K, le toujours stressé/déprimé dont le stressomètre aura probablement dépassé son plus haut point à Munich (moment mémorable en passant), et Stéphane T, que certains appellent le sapologue. Je pense également à Benjamin, le tout nouveau thésard en tee-shirt, bonne chance pour la suite. Je tiens à remercier Audrey Ridoux, la grande sportive, arrivée depuis peu et qui m'a beaucoup aidé ces derniers mois et avec qui il est toujours très agréable de travailler. Être « sa chef » aura été un plaisir pour moi.

Enfin, le « noyau dur du bureau des étudiants » Arnaud Tiendrébéogo et Emmanuel Paul. Arnaud, ta bonne humeur, ton rire communicatif et tes drôles d'expressions me manqueront beaucoup (ton goût prononcé pour les soirées qui se terminent en nuits blanches également...). Emmanuel, aka Emma, le « vieux mec », mon MAG, mon collègue de bureau préféré et j'en passe, que dire... Tu auras été mon complice durant ces trois ans, et c'est sûrement aussi grâce à toi que ces années de thèse auront été si riches en souvenirs. J'espère que « tu auras kiffé » toi aussi.

Merci à l'équipe 8, notamment à Emilie Bizard Planchot, le fossile capable de marcher 150 km en une journée.

Merci également aux personnels des différentes plateformes de l'IMRB que j'ai pu rencontrer, notamment Xavier Decrouy pour son aide précieuse au microscope confocal. Merci également aux secrétaires Julia Di Donato et Sandrine Bonizec pour leur disponibilité et leur aide indispensable.

Merci également aux Nathalie Herlin, Adèle Gerdil et Baptiste Cottin du CEA pour leur aide sur la caractérisation de mes nanoparticules.

Pour finir, je voudrais remercier profondément mon conjoint, Stephen, qui m'aura supportée et encouragée pendant toute ma thèse.

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	<i>I</i>
<i>Liste des figures et tableaux.....</i>	<i>VII</i>
<i>Préambule</i>	<i>IX</i>
1. Introduction	1
1.1. Les nanoparticules manufacturées	3
1.1.1. Définition	3
1.1.2. Les nanoparticules de dioxyde de titane	8
1.1.2.1. Présentation	8
1.1.2.2. Propriétés et applications.....	9
1.1.3. Les risques liés à l'exposition aux nanoparticules	12
1.1.3.1. Voies d'entrée et devenir des NP dans l'organisme	12
1.1.3.1.1. Voie respiratoire	13
1.1.3.1.2. Voie digestive	16
1.1.3.1.3. Voie cutanée	17
1.1.3.1.4. Voie parentérale.....	18
1.1.3.2. Internalisation cellulaire des NP.....	19
1.1.3.3. Toxicité pulmonaire des NP de TiO ₂	22
1.1.3.3.1. Etudes épidémiologiques	22
1.1.3.3.2. Etudes expérimentales	23
1.1.3.4. Toxicité extra-pulmonaire des NP de TiO ₂	26
1.1.3.5. Mécanismes moléculaires de la toxicité des NP.....	27
1.1.3.5.1. Stress oxydant	27
1.1.3.5.2. Inflammation	28
1.1.3.5.3. Génotoxicité.....	29
1.1.3.5.4. Interaction avec la corona protéique	30
1.1.3.6. Impact des caractéristiques physico-chimiques des NP sur leurs effets biologiques ..	32
1.1.3.6.1. La taille	33
1.1.3.6.2. La forme	35
1.1.3.6.3. La structure cristalline	36

1.1.3.6.4. Les propriétés de surface	37
1.2. L'autophagie.....	39
1.2.1. Mécanismes moléculaires du processus autophagique	41
1.2.1.1. Initiation de l'autophagie et formation de l'autophagosome.....	42
1.2.1.2. Elongation de l'autophagosome	44
1.2.1.3. Maturation des autophagosomes et fusion avec les lysosomes	45
1.2.1.4. Dégradation et recyclage du matériel cytoplasmique.....	46
1.2.2. Evaluation de l'activité autophagique	46
1.2.3. Rôle de l'autophagie et implication dans des pathologies	47
1.2.3.1. Autophagie et maladies pulmonaires non tumorales.....	48
1.2.3.2. Autophagie et cancers	51
1.2.3.3. Autophagie, inflammation et stress oxydant	52
1.3. Autophagie et nanoparticules	56
1.3.1. NP et accumulation d'autophagosomes	56
1.3.1. NP et flux autophagique	63
1.4. Synthèse du chapitre	70
2. Objectifs et démarche de l'étude	71
3. Matériels et méthodes	73
3.1. Caractérisation des nanoparticules étudiées	75
3.1.1. Microscopie électronique à transmission	75
3.1.2. Microscopie électronique à balayage associée à la microanalyse par énergie dispersive des rayons X.....	75
3.1.3. Diffraction des rayons X	76
3.1.4. Détermination de la surface spécifique	78
3.1.5. Mesure du potentiel zêta	79
3.1.6. Diffusion dynamique de la lumière	80
3.1.7. Dosage des endotoxines	81
3.1.8. Production intrinsèque de ROS	82
3.2. Etudes <i>in vitro</i>	84
3.2.1. Culture cellulaire	84
3.2.2. Exposition des cellules aux particules.....	84
3.2.3. Evaluation de la viabilité cellulaire	85

3.2.3.1. Test WST-1	85
3.2.3.2. Quantification de l'ADN.....	86
3.2.4. Observations cellulaires : microscopie électronique à transmission.....	87
3.2.5. Détermination de la transcription des gènes par qPCR.....	89
3.2.6. Détermination de l'expression des protéines	92
3.2.6.1. Western-blot.....	92
3.2.6.2. ELISA.....	96
3.2.7. Mesure du flux autophagique : utilisation de la sonde tandem mRFP-GFP-LC3	97
3.2.8. Analyse de la structure du cytosquelette par immunofluorescence	98
3.2.9. Dosage de l'activité des cathepsines	99
3.3. Analyses statistiques	100
4. Résultats	101
4.1. Résumé de l'article « Carbon nanotubes but not spherical nanoparticles block autophagy process by a shape-related targeting of lysosomes in murine macrophages »	104
4.2. Effets de différentes NP de TiO₂ et de nanotubes de carbone sur l'autophagie dans des macrophages murins.....	107
4.3. Résultats complémentaires.....	143
4.3.1. Modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie par les particules	143
4.3.1.1. Formation - élongation de l'autophagosome.....	143
4.3.1.2. Fusion autophagosome - lysosome.....	144
4.3.1.3. Fonction et biogenèse du lysosome.....	145
4.3.2. Stress oxydant et particules	147
4.3.3. Inflammation et particules.....	149
5. Discussion	153
5.1. Discussion méthodologique	155
5.1.1. Caractérisation des particules utilisées.....	155
5.1.2. Modèle cellulaire utilisé	157
5.1.3. Mode d'exposition aux NP.....	158

5.1.4.	Doses utilisées	160
5.1.5.	Caractérisation de l'autophagie	161
5.2.	Discussion des résultats	163
5.2.1.	Effets des NP sur l'autophagie	163
5.2.1.1.	Internalisation des particules dans des structures autophagiques	163
5.2.1.2.	Effet des particules sur le flux autophagique	164
5.2.1.3.	Effet des particules sur la formation et l'élongation des autophagosomes.....	166
5.2.1.4.	Effet des particules sur la fusion autophagosome/lysosome et sur la fonction lysosomale.....	167
5.2.2.	Effets des particules sur le stress oxydant et l'inflammation	170
5.2.3.	Lien entre autophagie, stress oxydant et inflammation.....	173
6.	Conclusions et perspectives.....	175
	Valorisation de la thèse	179
	Références bibliographiques.....	181
	Annexes.....	203
	Annexe 1	205
	Annexe 2.....	247

Liste des abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ag : argent

AIP : *aryl-hydrocarbon receptor-interacting protein*

Al₂O₃ : alumine

ALI : *air-liquid interface*

Ambra : *activating molecule in beclin 1-regulated autophagy*

AMC : *7-amino-4 methyl coumarin*

AMP : adénosine monophosphate

AMPK : *AMP-activated protein kinase*

AP-1 : *activator protein-1*

ARN : acide ribonucléique

ARNsi : petits ARN interférants

Atg : *autophagy related gene*

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : adénosine triphosphatase

Au : or

Baf A1 : bafilomycine A1

Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*

BET : Brunauer, Emmett et Teller

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

BSA : *bovin serum albumin*

CdS : sulfure de cadmium

CdSe : séléniure de cadmium

Ce : cérium

CeO₂ : dioxyde de cérium

Cellule M : *microfold cells*

CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

Cl⁻ : chlorure

CNRS : centre national de la recherche scientifique

CNT : *carbon nanotube*

CQ : chloroquine

CXCL1 : *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

DA : dopamine

DAMP : *damage-associated molecular pattern*

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DAPK : *death-associated protein kinase*

Deptor : *DEP domain-containing mTOR-interacting protein*

DMEM : *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSA : *dimercaptosuccinic acid*

dNTP : désoxyribonucléotide

DRAM : *damage-regulated autophagy regulator*

DRX : diffraction des rayons X

ECL : *enhanced chemiluminescence*

EDX : énergie dispersive de rayons X

EGFR : *epidermal growth factor receptor*

Egr-1 : *early growth response 1*

ELISA : *enzyme linked immunosorbent assay*

ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport*

Eu₂O₃ : oxyde d'euporium

Fe : Fer

Fe₃O₄ : oxyde de fer

FeTiO₃ : ilménite

FIP200 : *focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*

FITC : *fluorescein isothiocyanate*

GβL : *G protein β-subunit-like protein*

Gd₂O₃ : oxyde de gadolinium

GFP : *green fluorescent protein*

GQD : quantum dots de graphène

GTP : guanosine triphosphate

GTPase : guanosine triphosphatase
 H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
 HO-1 : hème oxygénase 1
 HOPS : *homotypic fusion and protein sorting*
 HRP : *horseradish peroxydase*
 Hsc : *heat shock cognate protein*
 Hsp : *heat shock protein*
 HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
 ICDD : *International Centre for Diffraction Data*
 IgG : immunoglobuline
 IL : *interleukin*
 InGAP : *indium gallium phosphide*
 IP3R : *inositol triphosphate receptor*
 Irgm1 : *immune related GTPase M-1*
 La_2O_3 : oxyde de lanthane
 LAMP : *lysosome-associated membrane protein*
 LBA : lavage broncho-alvéolaire
 LC3 : *microtubule associated-protein 1 light chain*
 LED : light-emitting diode
 LPS : lipopolysaccharide
 MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
 MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*
 MDC : monodansylcadaverine
 MEB : microscope électronique à balayage
 MET : microscope électronique à transmission
 MIP-2 : *macrophage inflammatory protein 2*
 MMLV : *moloney murine leukemia virus*
 MMP-2 : *matrix metalloproteinase-2*
 Mn : *manganèse*
 MTOC : *microtubule organising center*
 mTOR : mammalian target of rapamycin
 mTORC1 : mTOR complex 1
 MWCNT : *multi-walled carbon nanotube*
 NAC : N-acétylcystéine

NAF-1 : *nutrient-deprivation autophagy factor-1*

NC : noir de carbone

Nd₂O₃ : oxyde de néodyme

NF-κB : *nuclear factor-kappa B*

NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

NO : monoxyde d'azote

NP : nanoparticule

Nrf2 : *nuclear factor erythroid-derived 2 like 2*

O₂⁻ : ion superoxyde

PAA : acide polyacrylique

PABS : *polyaminobenzene sulfonic acid*

PAMAM : polyamidoamine

PBS : *phosphate buffered saline*

PCR : *polymerase chain reaction*

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PIGF : *placental growth factor*

PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol trisphosphate

PMM : potentiel de membrane mitochondrial

PMWCNT : *pristine MWCNT*

PRAS40 : *proline rich Akt substrate of 40 kDa*

PTEN : *phosphatase and tensin homolog*

PTX : pentoxifylline

PVA : polyvinylamine

PVDF : polyvinylidene fluoride

QD : quantum dots

Raptor : *regulatory associated protein of mTOR*

RIN : *RNA integrity number*

RIPA : *radioimmunoprecipitation assay*

RFP : *red fluorescent protein*

ROS : *reactive oxygen species*

RT-PCR : *real time PCR*

SDS : *sodium dodecyl sulfate*
 SF3A1 : *splicing factor 3a subunit 1*
 Si : silice
 SiO₂ : dioxyde de silicium
 Sm₂O₃ : oxyde de samarium
 SNAP29 : *synaptosomal-associated protein of 29 kDa*
 SNARE : *N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*
 SOD : superoxide dismutase
 SQSTM1 : sequestosome 1
 Stx17 : syntaxin 17
 SV40 : *simian virus 40 large T antigen*
 SVF : sérum de veau foetal
 SWCNT : *single-walled carbon nanotube*
 Tb₂O₃ : oxyde de terbium
 TGF-β : *transforming growth factor beta*
 Ti : titane
 TiCl₄ : tétrachlorure de titane
 TIMP-2 : *tissue inhibitor of metalloproteinase-2*
 TiO₂ : dioxyde de titane
 TLR : *toll-like receptor*
 TMB : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
 TMWCNT : *treated MWCNT*
 TNF-α : *tumor necrosis factor alpha*
 TRAF6 : *necrosis factor receptor-associated factor 6*
 TSC : *tuberous sclerosis complex*
 TTBS : *tween tris-buffered saline*
 UDG : *uracil DNA glycosylase*
 ULK : *UNC-51-like kinase*
 USPIO : *ultrasmall superparamagnetic iron oxide*
 UV : ultraviolet
 UVRAG : *UV radiation resistance-associated gene protein*
 VAMP8 : *vesicle-associated membrane protein 8*
 Vps34 : *vacuolar protein sorting 34*
 WST-1 : *water soluble tetrazolium salt- 1*

Y_2O_3 : oxyde d'yttrium

Yb_2O_3 : oxyde d'ytterbium

Zn : zinc

ZnO : oxyde de zinc

ZnS : sulfure de zinc

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Echelle de taille des nanoparticules comparées au monde du vivant	3
Figure 2 : Evolution du nombre d'objets commercialisés dans le monde contenant des NP	5
Figure 3 : Principales NP utilisées dans les produits de consommation courante	6
Figure 4 : Représentation de l'effet de taille sur l'émission de fluorescence de NP de CdSe/CdS	7
Figure 5 : Arrangement cristallographique des atomes du TiO ₂	8
Figure 6 : Comparaison de l'angle de contact entre une surface contrôle et une surface recouverte de NP de TiO ₂ . a. Exposées aux rayons UV b. Dans l'obscurité	11
Figure 7 : Voies potentielles d'exposition aux NP.....	13
Figure 8 : Dépôt des NP inhalées dans l'appareil respiratoire en fonction de leur taille	14
Figure 9 : Les différentes voies d'internalisation par endocytose.....	19
Figure 10 : Mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité des NP.....	32
Figure 11 : Les différents types d'autophagie	39
Figure 12 : Déroulement de l'autophagie.....	41
Figure 13 : Voies de signalisation mTORC1	43
Figure 14 : Relation hypothétique entre l'autophagie et les réponses biologiques aux nanomatériaux	55
Figure 15 : Principe de l'analyse par diffraction des rayons X. a. Interférences des ondes diffusées. b. Diffraction des rayons X d'un cristal.	77
Figure 16 : Enregistrements obtenus après analyse. a. Données obtenues par DRX. b. Diffractogrammes théoriques du dioxyde de titane.	77
Figure 17 : Charges et potentiels d'une particule	80
Figure 18 : Principe du test WST-1.....	86
Figure 19 : Schéma d'un dosage ELISA "en sandwich"	96
Figure 20 : Expression de gènes impliqués dans la formation et l'élongation de l'autophagosome	144

Figure 21 : Expression de gènes impliqués dans l'étape de fusion autophagosome-lysosome	145
Figure 22 : Expression de gènes lysosomaux.....	146
Figure 23 : Activité des cathepsines.....	146
Figure 24 : Expression de TFEB	147
Figure 25 : Expression de gènes impliqués dans la réponse anti oxydante.....	148
Figure 26 : Expression protéique de HO-1.....	149
Figure 27 : Expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire.....	151
Figure 28 : Production de cytokines inflammatoires	152
Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des NP pouvant influencer sur leur toxicité	33
Tableau 2 : Résumé des études décrivant les effets des NP sur l'autophagie sans évaluation du flux autophagique.....	62
Tableau 3 : Résumé des études décrivant les effets des NP sur l'autophagie avec évaluation du flux autophagique.....	68
Tableau 4 : Séquence des amorces des différents gènes étudiés.....	91
Tableau 5 : Anticorps utilisés en Western-Blot	95

Préambule

Depuis le début du XXIème siècle, les nanotechnologies sont en plein essor et suscitent un fort engouement industriel. Les nanoparticules présentent en effet des propriétés novatrices rendant cette classe de matériaux très intéressante pour l'industrie toujours à la recherche d'innovation. Les champs d'applications des nanoparticules manufacturées sont déjà très nombreux (produits cosmétiques, agroalimentaire, électronique ...), et on peut prédire sans risque qu'ils vont continuer à connaître un développement important dans les prochaines années.

Cependant, et malgré des bénéfices potentiels importants dans de nombreux domaines, l'utilisation croissante de ce type de matériaux soulève des inquiétudes quant à leur éventuelle nocivité. En effet, les données épidémiologiques sur les particules atmosphériques, ainsi que les caractéristiques inédites des nanoparticules sont autant d'information ayant incité la communauté scientifique à s'interroger sur les risques potentiels de ces matériaux sur la santé.

Cette thèse a pour but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la toxicité cellulaire des nanoparticules et leur relation avec les paramètres physico-chimiques des nanoparticules. En effet, bien qu'un certain nombre de mécanismes aient été mis en évidence (notamment le stress oxydant et l'inflammation), l'apparition de ces effets n'est pas systématique et semble dépendre des caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules. Les données disponibles au début de cette thèse pouvaient suggérer une implication de l'autophagie dans les effets biologiques des nanoparticules sans toutefois conclure sur l'effet des nanoparticules sur le processus autophagique.

Nous nous sommes concentrés sur les nanoparticules de dioxyde de titane en raison de leur fort intérêt technologique et de leur importante production. Les effets biologiques, et plus spécifiquement sur l'autophagie, d'un panel de ces nanoparticules possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes ont été étudiés *in vitro* sur un modèle cellulaire pulmonaire.

Un état des lieux du développement des nanoparticules et des risques pour la santé humaine sera présenté. Après avoir exposé les objectifs et la démarche retenue pour l'étude, les matériels et méthodes utilisés seront décrits. Les résultats obtenus seront ensuite détaillés dans une quatrième partie sous la forme d'un article et de résultats complémentaires ; puis l'ensemble des résultats et leurs perspectives seront discutés dans une dernière partie.

Ce travail a été réalisé sous la direction du docteur Sophie Lanone et du Professeur Jean-Claude Pairon au sein de l'équipe 4 "Physiopathologie de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et autres conséquences respiratoires de l'inhalation de particules de l'environnement" co-dirigée par le docteur Sophie Lanone et le Professeur Jorge Boczkowski, à l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale, INSERM U955, à Créteil. Cette thèse a été réalisée à l'Ecole Doctorale Agriculture Biologie Environnement Santé (ED 435 ABIES) et a été financée par C'Nano Ile-de-France.

CHAPITRE 1

1. Introduction

1.1. Les nanoparticules manufacturées

1.1.1. Définition

Les nanomatériaux sont définis comme étant un assemblage de particules dont au moins 50% d'entre elles présentent une ou plusieurs dimensions inférieures à 100 nm (SCENIHR 2010). Leur taille est ainsi comparable à celle d'un virus, de l'ADN ou encore de protéines (Figure 1).

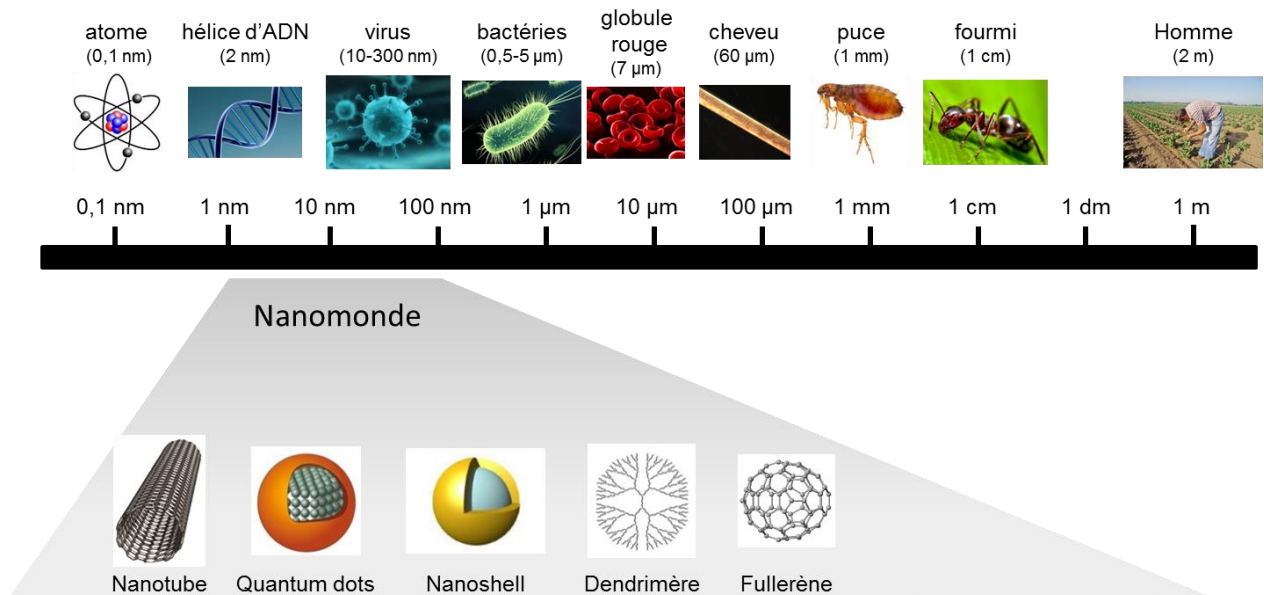


Figure 1 : Echelle de taille des nanoparticules comparées au monde du vivant

Les nanomatériaux peuvent provenir de plusieurs origines. On distingue ainsi :

- les nanomatériaux d'origine naturelle, résultant principalement de l'érosion, de l'activité volcanique ou des feux de forêts.
- les nanomatériaux d'origine anthropique non intentionnelle, comme ceux issus de l'industrie, de la combustion des moteurs ou encore ceux provenant des fumées de soudure.

- les nanomatériaux d'origine anthropique intentionnelle, appelés plus communément nanoparticules manufacturées, fabriquées par l'homme dans l'optique d'une utilisation industrielle.

Le terme de « particules ultrafines » est généralement utilisé pour faire référence aux nanomatériaux émis par des sources non intentionnelles, en particulier d'origine naturelle ou anthropique tandis que le terme « nanoparticules » est réservé aux particules manufacturées.

Les différents groupes de normalisation ont défini la gamme de taille d'une nanoparticule (NP) comme allant de 1 à 100 nm (ISO/TS 27687:2008). La limite inférieure de cette échelle de taille est introduite pour permettre la distinction entre les nanoparticules et les atomes seuls ou encore les petites molécules. La limite supérieure de 100 nm est justifiée par le fait, qu'en général, il s'agit de l'ordre de grandeur maximal pour lequel les propriétés physico-chimiques des NP s'expriment (Borm et al. 2006). En effet, la spécificité et l'intérêt des nanoparticules est qu'elles ne possèdent pas les mêmes propriétés que leurs homologues de plus grande taille. Cela est principalement dû à deux facteurs : les effets de surface et les effets quantiques (Roduner 2006). Lorsque la taille d'une particule diminue, le nombre d'atomes présents à sa surface par rapport au nombre d'atomes total augmente de façon considérable. Les NP ont ainsi un rapport surface/volume ou surface/masse beaucoup plus élevé qu'une particule de taille micrométrique. De nombreuses réactions chimiques se déroulant en surface, la réactivité de surface d'une NP est beaucoup plus importante que celle d'une particule micrométrique. De plus, contrairement aux matériaux classiques où les facteurs qui régissent les propriétés de la matière ne dépendent pas de la taille, les NP sont soumises aux lois de la physique quantique qui modifient leurs propriétés en fonction de leur taille.

Ces nouvelles propriétés des NP les rendent particulièrement intéressantes pour les industriels. Les nanoparticules sont ainsi utilisées depuis de nombreuses années par les industries (chimique, électronique, automobile, aéronautique, agro-alimentaire, textile, etc.) et sont présentes dans divers produits de consommation courante. Le marché mondial des nanotechnologies est en plein essor et devrait continuer à croître dans les prochaines années. Ainsi, d'après l'inventaire du *Project on Emerging Nanotechnologies (The Project on*

Emerging Nanotechnologies 2013), le nombre de produits de consommation contenant des nanomatériaux sur le marché mondial est passé de 54 en 2005 à 1628 en 2013, dont 440 au niveau européen (Figure 2). Une nette majorité de ces produits, au total 788, concerne les produits de beauté / parapharmacie (cosmétiques et crèmes solaires notamment) et le domaine du textile. Les NP d'argent sont les plus répandues dans les produits recensés et représentent un peu plus de 20% du nombre total de produits listés. Les NP de titane (principalement sous forme de dioxyde de titane TiO_2), et qui nous intéressent plus particulièrement dans le cadre de cette thèse, sont les deuxièmes les plus référencées, avec 179 produits cités, soit environ 10% du nombre total de produits (Figure 3). Les autres NP les plus utilisées sont actuellement le carbone (dont les nanotubes de carbone), la silice, le zinc et l'or.

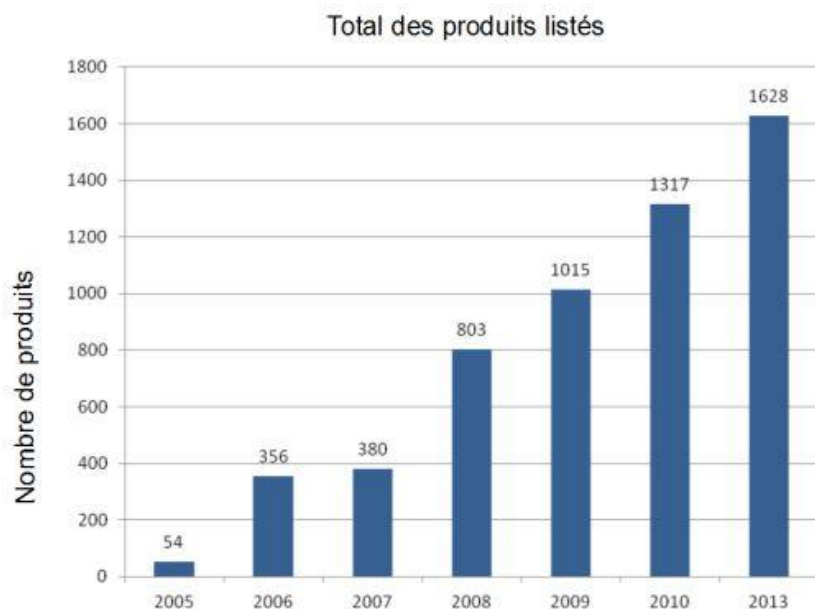


Figure 2 : Evolution du nombre d'objets commercialisés dans le monde contenant des NP
(The Project on Emerging Nanotechnologies 2013)

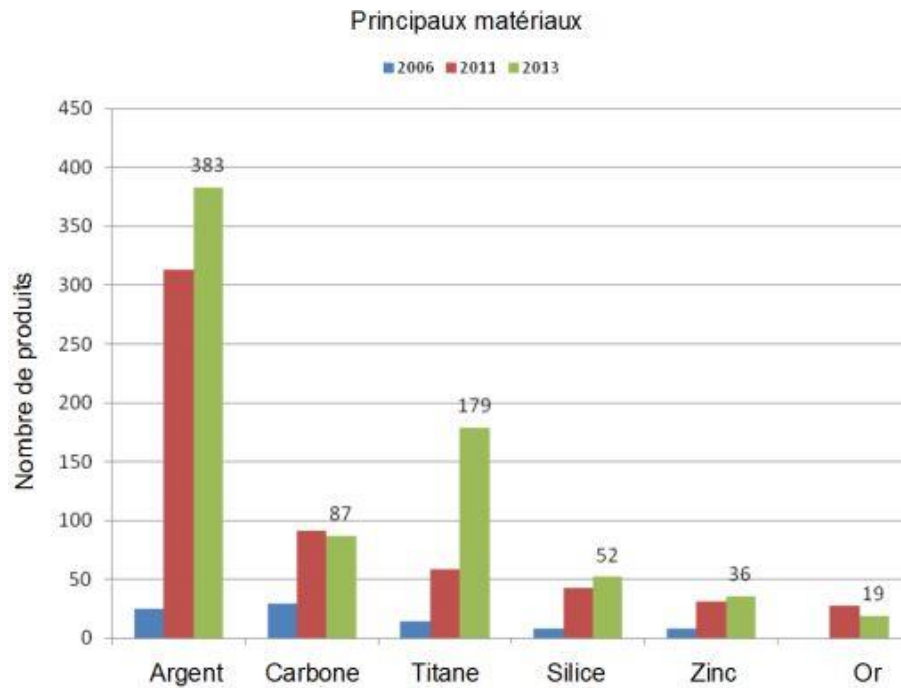


Figure 3 : Principales NP utilisées dans les produits de consommation courante
(The Project on Emerging Nanotechnologies 2013)

L'utilisation grandissante des NP par les industries vient de leur fort potentiel d'innovation. Les NP peuvent en effet être incorporées dans une variété de matériaux pour leur donner certaines propriétés. Ainsi, et à titre d'exemple, les quantum dots, nanocristaux de matériaux semi-conducteurs souvent qualifiés d'« atomes artificiels » en raison de leur taille (seulement quelques nanomètres de diamètre) sont largement utilisés dans l'industrie. En effet, une des particularités des quantum dots est le changement de leurs propriétés optiques en fonction de leur taille, illustré en Figure 4. Ces propriétés permettent leur utilisation dans la fabrication d'écrans, de LED, de lasers mais aussi en médecine. En effet, en les incorporant dans les écrans (télévisions, tablettes, smartphones) et en changeant seulement leur taille, les quantum dots permettent d'offrir une gamme de couleurs jusqu'alors inégalée, d'en renforcer l'intensité tout en réduisant la consommation électrique. De plus, les quantum dots, de par l'utilisation de leurs propriétés de fluorescence, sont également de potentiels biomarqueurs en médecine permettant des diagnostics *in vitro* et *in vivo* et sont de ce fait porteurs de grands espoirs dans ce domaine.

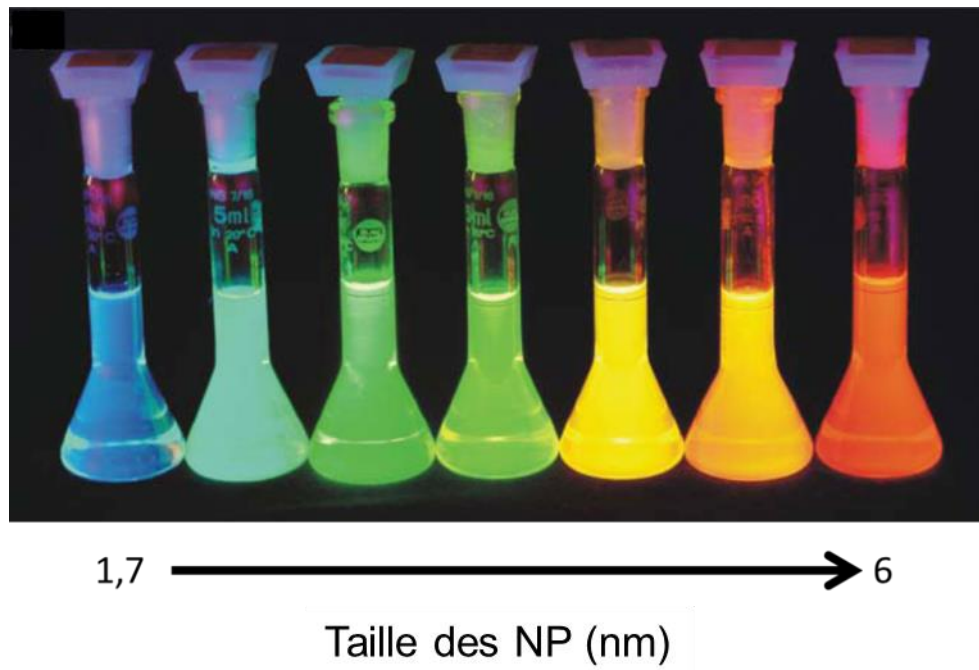


Figure 4 : Représentation de l'effet de taille sur l'émission de fluorescence de NP de CdSe/CdS
(Roduner 2006)

De même, les propriétés mécaniques des nanotubes de carbone associées à leur légèreté en font des composants très utilisés dans les équipements sportifs (raquettes de tennis, clubs de golf, cadres de vélo) et en aéronautique (fuselages d'avion). En effet, pour une quantité équivalente, les nanotubes de carbone sont jusqu'à six fois plus légers et six fois plus résistants que l'acier (Behabtu et al. 2008). Certaines particules d'oxydes métalliques (notamment les oxydes de titane et de zinc) ont la capacité d'absorber les ultra-violets et sont de ce fait utilisées pour la fabrication de crème solaire ; cependant, un des inconvénients majeurs de ces particules de taille micrométrique est qu'elles peuvent rendre la crème difficile à étaler et qu'elles peuvent laisser des traces blanches sur la peau. Ainsi, en remplaçant ces particules micrométriques par des NP de même composition chimique, celles-ci confèrent fluidité et bonne tenue à la crème tout en gardant la protection contre les UV.

1.1.2. Les nanoparticules de dioxyde de titane

1.1.2.1. Présentation

Le titane (Ti) est le neuvième composant le plus abondant sur Terre. La concentration moyenne de Ti dans la croûte terrestre est de 4400 mg/kg. Grâce à sa grande affinité pour l'oxygène et d'autres éléments (fer et calcium notamment), le Ti n'existe pas sous forme métallique dans la nature. On le retrouve le plus souvent sous forme ionique Ti^{4+} , Ti^{3+} ou Ti^{2+} . Dans l'industrie, les principales formes utilisées sont le Ti sous forme métallique, le dioxyde de titane TiO_2 et le tétrachlorure de titane $TiCl_4$. Le TiO_2 , également désigné sous le nom d'oxyde de titane, d'acide titanique anhydre, ou de blanc de titane se présente sous la forme d'une poudre de couleur blanche de masse molaire 79,9 g/mol, et insoluble dans l'eau ou autres solvants organiques. Le TiO_2 peut se présenter sous trois formes selon l'arrangement cristallographique des différents atomes le composant : sous formes tétraogonales rutile ou anatase et sous forme orthorhombique brookite (Figure 5). Le rutile est la forme la plus commune, la plus stable, chimiquement inerte et peut être excité par la lumière visible ou UV (Austin and Lim 2008; Hashimoto et al. 2005). L'anatase peut seulement être excitée par la lumière UV et peut être transformée en rutile, forme plus stable, si elle est chauffée à plus de 700°C, ce qui est également le cas du brookite.

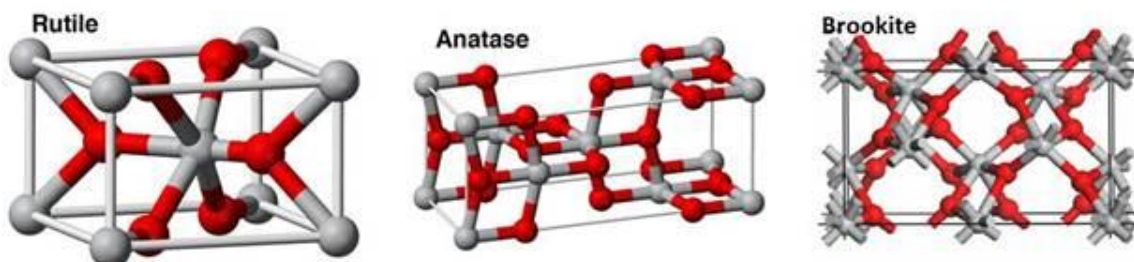


Figure 5 : Arrangement cristallographique des atomes du TiO_2

(Austin and Lim 2008; Woodley and Catlow 2009)

Les atomes de titane sont en gris et ceux d'oxygène sont en rouge.

Le TiO_2 a été découvert en 1791 en Angleterre mais son exploitation commerciale sous forme non nanométrique n'a débuté qu'au début du XX^{ème} siècle. Les poudres de TiO_2 micrométrique sont généralement préparées en utilisant le « procédé au chlore » au cours duquel le titane est séparé du minerai qui le contient (en général l'ilménite FeTiO_3) en le chauffant à très haute température en présence de dichlore, puis par oxydation du composé intermédiaire TiCl_4 . Récemment, plusieurs méthodes ont été développées dans le but de synthétiser des NP de TiO_2 , comme par exemple la méthode sol-gel, la synthèse solvothermale, le dépôt chimique en phase vapeur ou encore la synthèse par pyrolyse laser (Chen and Mao 2007).

1.1.2.2. Propriétés et applications

Le TiO_2 est un des pigments blancs les plus utilisés dans le monde. Ceci est notamment dû à son indice de réfraction très élevé qui fait de lui un des pigments blancs les plus opaques sur le marché actuel. Environ 4 millions de tonnes de ce pigment sont consommés dans le monde chaque année et le TiO_2 représente 70% du volume de production total des pigments dans le monde (Baan et al. 2006). Grâce à ses propriétés, le TiO_2 micrométrique est utilisé comme pigment dans les peintures, les revêtements, les plastiques, le papier, les encres, l'industrie alimentaire, les médicaments mais aussi dans la plupart des dentifrices afin de rendre ces produits plus blancs. Il est également utilisé pour rendre plus blanc le lait écrémé. Concernant les NP de TiO_2 , celles-ci sont les deuxièmes les plus représentées dans les produits contenant des NP actuellement sur le marché (The Project on Emerging Nanotechnologies 2013).

En raison de leur surface spécifique plus élevée, les NP de TiO_2 (surtout sous la forme anatase) présentent des propriétés photocatalytiques améliorées par rapport aux particules de plus grande taille : elles sont susceptibles de générer des espèces réactives de l'oxygène après exposition aux UV et réactions avec l'eau ou l'oxygène. Ces propriétés sont très intéressantes pour les industriels qui utilisent les NP de TiO_2 pour la fabrication de nombreux revêtements de façades de bâtiments (ciments et verre). En effet, des particules inorganiques (provenant essentiellement de la pollution) mais aussi des organismes comme des bactéries ou des champignons se déposent et s'accumulent avec le temps sur les façades des bâtiments et peuvent fragiliser voire même aboutir à la destruction de ces édifices. Incorporées aux

revêtements de ces façades, les NP de TiO_2 permettent, via des réactions de photocatalyse et la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), d'oxyder ces particules (poussières et microorganismes) et ainsi d'améliorer la durabilité et l'esthétique des bâtiments. Par le même procédé, les NP de TiO_2 permettent également de décontaminer l'air et l'eau et sont donc utilisées comme agents dépolluants (Bogdan et al. 2015).

Par ailleurs, une des autres propriétés des NP de TiO_2 est leur puissante hydrophilie, induite sous lumière UV, et appelée superhydrophilie. Sur une surface recouverte d'une fine couche de NP de TiO_2 et exposée aux rayons UV, l'angle de contact entre la surface du matériau solide et une goutte d'eau par exemple, sera beaucoup plus faible (proche de 0°) que si le matériau n'était pas recouvert de NP de TiO_2 . Cela signifie que les gouttes d'eau auront tendance à s'agglomérer pour former un film recouvrant le matériau. Ainsi, l'eau s'écoulera beaucoup plus facilement sur un matériau recouvert de NP de TiO_2 , permettant un lavage sans traces dues à l'évaporation (Figure 6a). De plus, ces surfaces recouvertes de NP de TiO_2 gardent leurs propriétés dans l'obscurité, en absence de lumière UV. En effet, les NP de TiO_2 possèdent également des propriétés superhydrophobes. Cette fois, l'angle de contact sera beaucoup plus élevé (supérieur à 90°) sur un matériau recouvert de NP de TiO_2 . Les gouttes d'eau ne pourront alors pas s'accrocher à la surface, et sous l'effet de la gravité, couleront le long du support en entraînant avec elles tous les petits résidus de saletés (Figure 6b). L'association des propriétés d'hydrophilie/hydrophobie et de photocatalyse des NP de TiO_2 en font d'excellents matériaux autonettoyants, c'est pourquoi elles sont utilisées dans la fabrication de miroirs, de verres antibuée, de peintures mais aussi dans la fabrication de textiles.

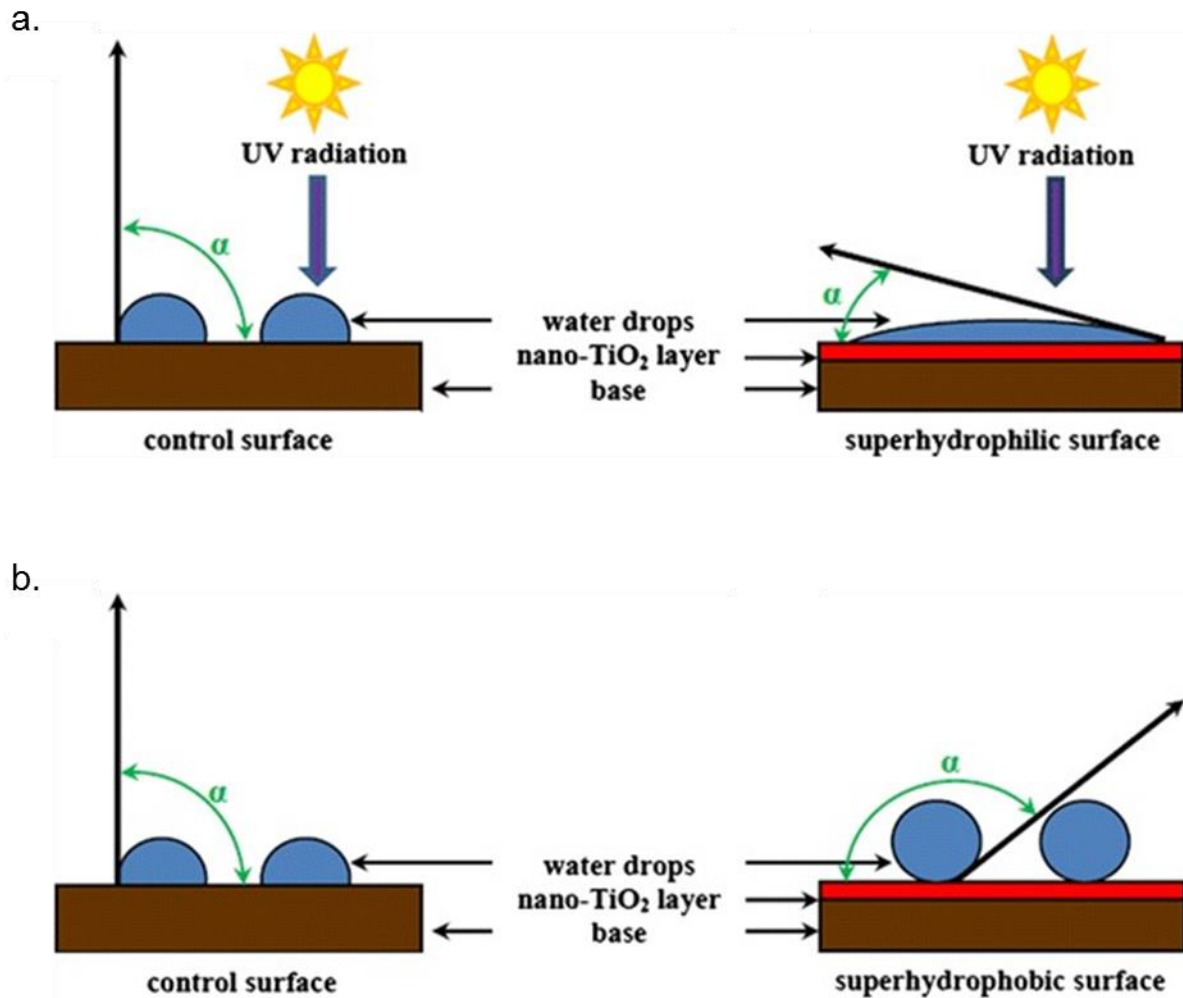


Figure 6 : Comparaison de l'angle de contact entre une surface contrôle et une surface recouverte de NP de TiO₂. a. Exposées aux rayons UV b. Dans l'obscurité
(Bogdan et al. 2015)

Les NP de TiO₂ promettent également de futures applications dans le domaine de la nanomédecine. En effet, les NP de TiO₂ pourraient être utilisés comme potentiels outils dans le domaine de l'imagerie médicale, en tant qu'agent de contraste et en nanothérapie, notamment pour cibler et traiter les tumeurs (Skocaj et al. 2011). Des chercheurs étudient également le potentiel de préparations contenant des NP de TiO₂ comme traitements de maladies dermatologiques comme l'acné et l'eczéma ou dans le traitement de verrues ou de lésions hyperpigmentées (Wiesenthal et al. 2011).

Les applications des nanomatériaux sont donc très variées, touchent beaucoup de domaines industriels différents et se retrouvent dans une large gamme de produits de consommation courante, accessibles à tous. Cette présence grandissante des nanotechnologies dans notre quotidien pousse donc les scientifiques à se poser la question de leur impact sur l'environnement et la santé publique.

1.1.3. Les risques liés à l'exposition aux nanoparticules

Face au développement des nanotechnologies, des inquiétudes sont émises quant à l'éventuelle toxicité pour l'Homme d'une exposition aux NP. En effet la production et l'utilisation grandissante de des matériaux augmentent le risque d'exposition de l'Homme à ces NP, exposition qui risque de s'amplifier avec l'accroissement de l'utilisation de celles-ci au cours des prochaines années. L'être humain peut être en contact avec les nanomatériaux à tout moment de la vie de ceux-ci : au stade de fabrication, où les travailleurs peuvent être exposés dans un contexte professionnel, mais aussi au stade de la commercialisation et de fin de vie du nanomatériau, où les consommateurs peuvent également être exposés. L'inquiétude de l'éventuelle toxicité humaine des NP est justifiée par le fait que celles-ci sont comparables, d'un point de vue de la taille, aux particules ultrafines de la pollution atmosphérique dont la toxicité a été mise en évidence chez l'Homme (Oberdorster et al. 2005; Terzano et al. 2010). Même si l'étude des effets toxicologiques des NP s'est fortement développée ces dernières années, les données actuelles sur le sujet restent encore insuffisantes. Cependant, plusieurs études démontrent que les NP peuvent pénétrer dans l'organisme via différentes voies et induire des effets toxiques systémiques (Shi et al. 2013).

1.1.3.1. Voies d'entrée et devenir des NP dans l'organisme

Les NP peuvent entrer en contact avec l'organisme de plusieurs façons : par inhalation (voie respiratoire), par contact avec la peau (voie cutanée), par ingestion (voie digestive), et dans le cas d'applications biomédicales, par injection (voie parentérale) (Figure 7).

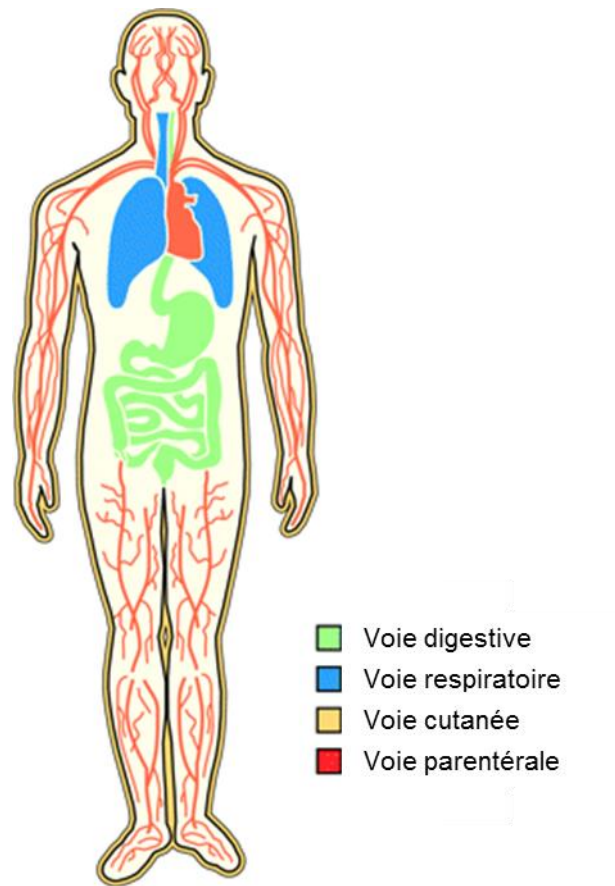


Figure 7 : Voies potentielles d'exposition aux NP
(Stern and McNeil 2008)

1.1.3.1.1. Voie respiratoire

Les particules solides peuvent être inhalées par l'Homme si leur diamètre est inférieur à 10 μm (Hoet et al. 2004). Les NP, du fait de leur taille, peuvent ainsi être facilement inhalées, et ce d'autant plus qu'elles sont très volatiles et facilement aérosolisables. Une fois inhalées, les NP peuvent se déposer tout le long de l'appareil respiratoire, du nez et du pharynx jusqu'aux poumons et aux alvéoles. Les poumons humains possèdent environ 300 millions d'alvéoles présentant une surface d'échange totale comprise entre 75 et 140m², soit l'équivalent d'un terrain de tennis (Hoet et al. 2004). Cette impressionnante surface d'échange, combinée à la forte volatilité des NP, fait de l'appareil respiratoire la principale voie d'entrée des NP dans l'organisme, notamment en contexte professionnel, et ainsi l'une des voies les plus étudiées (Oberdorster et al. 2005) .

Les NP se déposent principalement dans l'appareil respiratoire via le phénomène de diffusion par lequel les NP se mettent en mouvement grâce aux collisions avec les molécules composant l'air. La localisation de ce dépôt dans l'appareil respiratoire dépend de la taille, de l'état d'agglomération mais aussi de la forme de la particule. D'après un modèle mathématique prédictif, et dans le cas de particules sphériques non agglomérées, les microparticules et les NP plus petites que 5 nm de diamètre auront tendance à se déposer dans la région extra thoracique (nez, bouche, pharynx et larynx) tandis que les NP de 5 à 100 nm de diamètre se déposeront principalement dans la région alvéolaire (International Commission on Radiological Protection. 1994) (Figure 8). Pour les particules sous forme de fibres, les fibres de faible longueur se déposeront plus loin dans l'appareil respiratoire tandis que les fibres très longues (de longueur supérieure à 20 μm) se déposeront dans les voies aériennes supérieures (Oberdorster 2002; Warheit et al. 2001).

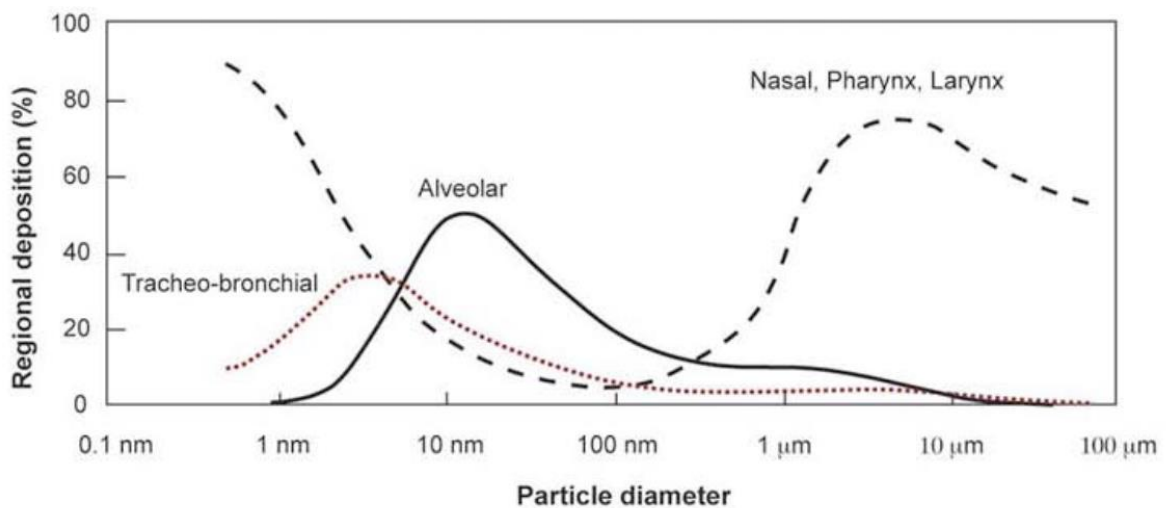


Figure 8 : Dépôt des NP inhalées dans l'appareil respiratoire en fonction de leur taille
(Buzea et al. 2007)

Des mécanismes de clairance sont mis en œuvre par l'organisme pour éliminer les particules déposées dans l'appareil respiratoire. Le mécanisme principal de clairance des particules au niveau des voies aériennes supérieures est l'escalator mucociliaire. Cette région est tapissée d'un mucus qui, emmené par le mouvement des cils, va piéger les particules présentes et les emmener jusqu'au pharynx pour une élimination dans le tractus gastro-intestinal. Dans les régions alvéolaires plus profondes, la clairance des NP se fait essentiellement via la phagocytose par les macrophages alvéolaires. Une partie de ces

macrophages, après avoir phagocyté les NP, va migrer de la région alvéolaire vers l'escalator mucociliaire, où ils entreront dans le système gastro-intestinal. Ce mécanisme de clairance peut être très long. En effet, la demi-vie d'une particule solide dans la région alvéolaire est environ de 70 jours chez le rat et peut aller jusqu'à 700 jours chez l'Homme (Oberdorster et al. 2005).

L'efficacité de ce mécanisme de clairance dépend beaucoup de la capacité du macrophage à repérer le site de dépôt des NP et à les phagocyter, ce dernier processus dépendant des caractéristiques des NP. En effet, les macrophages peuvent phagocyter des particules de taille comparable à la leur, soit de 14 à 21 μm pour les macrophages alvéolaires humains et de 10 à 13 μm de diamètre pour les macrophages alvéolaires de rats (Oberdorster 2002), mais sont nettement moins efficaces avec des particules beaucoup plus petites. En effet, plusieurs études réalisées chez le rat ont montré qu'après une exposition de 24h à des particules de différentes tailles, environ 80 % des particules de taille supérieure à 500 nm étaient retrouvées dans les macrophages alvéolaires tandis que seulement 20 % des NP y avaient été internalisées, les 80% restants étant retrouvées dans l'épithélium et l'interstitium pulmonaires (Oberdorster et al. 2005). De plus, une étude menée sur des rats exposés par inhalation sur 12 semaines à des particules de TiO_2 de différentes tailles (250 nm de diamètre vs 20 nm de diamètre) a montré que les NP de TiO_2 (20 nm) présentaient un temps de rétention dans le poumon plus long que les particules de taille plus importante (Oberdorster et al. 1994). Cette rétention prolongée des NP de TiO_2 serait le résultat d'une mauvaise clairance des NP par les macrophages. Plus récemment, Geiser *et al* ont montré que des NP de TiO_2 de 20 nm de diamètre n'étaient presque pas internalisées par les macrophages (Geiser et al. 2008).

Ces mécanismes de clairance ne sont donc pas totalement efficaces. Les NP qui ne sont pas internalisées par les macrophages alvéolaires restent dans les alvéoles et peuvent alors interagir avec les cellules de l'épithélium alvéolaire. En effet, de nombreuses études ont prouvé que des NP déposées dans l'appareil respiratoire pouvaient atteindre les cellules épithéliales mais aussi l'interstitium pulmonaire (Oberdorster et al. 2005). Une fois que les NP ont atteint l'espace interstitiel, elles pourront rentrer dans les systèmes circulatoires et lymphatiques et atteindre d'autres sites dans l'organisme. En effet, des NP de TiO_2 ont été retrouvées dans l'interstitium alvéolaire que ce soit après une exposition par inhalation ou via une instillation intra trachéale (Eydner et al. 2012; Oberdorster et al. 1994; Sager et al. 2008). De plus, 28 jours après instillation, une fraction de ces NP est capable d'accéder au système circulatoire et d'atteindre des sites extra pulmonaires comme le foie et les reins (Li et al.

2010b). De même, une étude menée sur des rats exposés à des NP de TiO₂ par inhalation a montré que ces NP pouvaient traverser la barrière alvéolo-capillaire et être retrouvées dans le cœur, notamment au niveau des fibroblastes cardiaques (Geiser et al. 2005). L'efficacité de la translocation à travers la barrière pulmonaire dépend fortement du type de NP, de la dose administrée et de l'efficacité des systèmes de clairance (Braakhuis et al. 2014; Geiser and Kreyling 2010)

1.1.3.1.2. Voie digestive

La voie digestive représente également une importante voie d'entrée des NP dans l'organisme. Celle-ci peut se faire de façon directe via l'ingestion de produits contenant des NP, comme des produits alimentaires, de l'eau, des médicaments ou des produits cosmétiques (dentifrice ou rouge à lèvres), ou de façon indirecte via la déglutition du mucus d'origine pulmonaire contenant les NP déposées dans l'appareil respiratoire après inhalation. La consommation alimentaire de NP et de microparticules dans les pays développés est estimée à 10¹² particules par personne et par jour (Borm et al. 2006). Etant donné sa large utilisation dans le domaine alimentaire, la plupart de ces particules sont des particules de TiO₂. Selon les études et les habitudes alimentaires, les estimations de consommation alimentaire de NP de TiO₂ diffèrent : certains estiment le niveau d'exposition très faible avec 0,035 mg/kg/jour (Frohlich and Roblegg 2012) tandis que d'autres estiment cette consommation à 1-2 mg/kg/jour pour un enfant et environ 0,2-0,7 mg/kg/jour pour un adulte (Weir et al. 2012).

Les NP peuvent intégrer l'organisme en transloquant à travers la barrière intestinale. A ce jour, seulement quelques études se sont intéressées à cette voie d'exposition et la plupart ont montré que la majorité des NP étaient éliminées rapidement via les fèces avec peu de passage à travers la barrière intestinale (Cho et al. 2013; Fisichella et al. 2012; Song et al. 2015). Cependant, d'autres études ont démontré que certaines NP étaient capables de transloquer à travers la barrière intestinale pour atteindre le système circulatoire et se retrouver dans le foie, la rate, et les reins (Bergin and Witzmann 2013). Concernant le TiO₂, des chercheurs ont montré que des NP de TiO₂ (< 25 nm) étaient retrouvées dans la rate et les ovaires de souris exposées à 1 mg/kg pendant 5 jours par voie orale (Tassinari et al. 2014). De plus, chez la souris, la translocation de NP de TiO₂ (12 nm) a été observée 6 heures après une exposition à un seul gavage (12,5 mg/kg) (Brun et al. 2014).

La translocation des particules de TiO_2 à travers l'appareil digestif se ferait essentiellement au niveau des plaques de Peyer, petits agrégats lymphoïdes intestinaux, concentrés dans l'intestin grêle, et représentant une des premières lignes de défense du tractus digestif. Ce tissu est majoritairement composé en surface de cellules M (*microfold cells*), cellules possédant une forte capacité d'endocytose et de phagocytose. Ces cellules sont spécialisées dans l'absorption et la translocation de grandes molécules, bactéries et virus depuis la lumière intestinale vers les cellules immunitaires sous-jacentes pour un déclenchement de la réponse immunitaire (Houdeau 2012). En effet, dans l'étude de Brun *et al*, l'élément titane a été retrouvé, dans des expériences *in vivo* et *ex vivo*, au niveau des plaques de Peyer mais aussi dans les muqueuses de l'iléon, suggérant un passage des NP via les cellules M et les entérocytes. De plus, les auteurs ont également suggéré un passage paracellulaire des NP de TiO_2 résultant d'une altération de l'intégrité épithéliale via un remodelage des jonctions serrées chez les souris exposées (Brun et al. 2014).

1.1.3.1.3. Voie cutanée

Cette voie d'entrée n'est pas négligeable étant donné le nombre important de produits à application cutanée contenant des NP notamment les produits cosmétiques ou les crèmes solaires qui contiennent des NP de TiO_2 . La peau est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. La portion la plus externe de l'épiderme, la couche cornée (ou *stratum corneum*) est une couche de 10 μm d'épaisseur composée de kératinocytes morts et qui est quasiment imperméable aux particules inorganiques. Les résultats des différentes études sur l'absorption des NP par la peau sont contradictoires. La plupart des études montrent que les NP de TiO_2 ne pénètrent pas, ou alors peu, la peau humaine : bien que les NP soient observées au niveau de la couche cornée, celles-ci sont absentes des couches plus profondes de l'épiderme et du derme, et ce quelle que soit la taille, la forme ou la composition de surface des NP de TiO_2 (Gamer et al. 2006; Monteiro-Riviere et al. 2011; Sadrieh et al. 2010). Des résultats similaires ont été observés par Sensui et ses collaborateurs *in vitro*. Quatre NP de TiO_2 de structure rutile avec différents recouvrements de surface ont été testées sur de la peau intacte ou lésée de cochons nains. Les résultats montrent que les NP de TiO_2 n'ont pas pénétré la peau, même dans le cas de la peau lésée (Senzui et al. 2010).

Cependant, certaines études indiquent des résultats contraires. En effet, l'application d'une crème solaire contenant 8 % de NP de TiO_2 (10-50 nm) deux fois par jour pendant 2 à 6

semaines sur la peau de volontaires montre un niveau plus élevé de NP de TiO₂ dans l'épiderme et le derme des volontaires comparé à celui des contrôles, sans que la différence observée ne soit significative, du fait du trop faible effectif de sujets (Tan et al. 1996). De même, la pénétration de NP de TiO₂ (20 nm) dans la peau, à partir d'une émulsion huile-eau est possible, notamment via les follicules pileux (Bennat and Muller-Goymann 2000; Tsuji et al. 2006). Plus récemment, des études ont montré qu'une pénétration de NP à travers la peau pouvait se produire : des NP de zinc ont en effet été retrouvées, en faible quantité, dans le sang et l'urine, chez l'Homme, après application, pendant 5 jours, d'une crème solaire, contenant ces NP (Gulson et al. 2010; Gulson et al. 2012).

Ainsi l'épiderme semble être une barrière efficace pour empêcher la pénétration des particules. Cependant, la pénétration des NP dans la peau reste sujette à débat au vu du manque d'études sur le sujet. De plus, les questions relatives au devenir des particules qui auraient pénétré la peau sont toujours sans réponse.

1.1.3.1.4. Voie parentérale

L'administration intraveineuse de NP est une voie potentielle d'exposition aux NP et a comme origine principale la nanomédecine avec l'administration de médicaments. Les NP injectées par voie intraveineuse se propagent rapidement à travers le système circulatoire et peuvent potentiellement transloquer dans les organes de l'organisme. Plusieurs études ont montré que des NP de composition chimique (quantum dots, or, fullerènes ...) et de taille variées, après injection intraveineuse, pouvaient être localisées dans différents organes comme le foie, la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, l'intestin, le cerveau et les poumons (Oberdorster et al. 2005). Des chercheurs ont étudié la distribution tissulaire des NP de TiO₂ administrées après une injection intraveineuse unique (5 mg/kg) chez le rat (Fabian et al. 2008). Les résultats indiquent une localisation des NP de TiO₂ dans le foie principalement, mais aussi, et dans des proportions décroissantes, dans la rate, les poumons et les reins. Ces résultats ont été confirmés par Elgrabli *et al* où des NP de TiO₂ étaient retrouvées en majorité dans le foie (92%) mais aussi dans la rate (3,5%) et les poumons (0,7%) de rats injectés avec 1.7 mg de NP. Ces NP étaient détectables dans ces organes jusqu'à 56 jours après injection.

La voie parentérale est beaucoup moins étudiée que les autres, néanmoins avec le développement de la nanomédecine, celle-ci devrait être plus prise en compte, notamment pour des considérations toxicologiques.

1.1.3.2. Internalisation cellulaire des NP

Tout comme les nano-organismes (virus), les NP sont capables d'entrer à l'intérieur des cellules et d'interagir avec les composants cellulaires et d'induire potentiellement une toxicité. De nombreuses études révèlent que la plupart des NP sont activement internalisées dans la cellule via différents processus d'endocytose parmi lesquels la phagocytose et la pinocytose (Figure 9), mais également par diffusion passive (Beddoes et al. 2015; Kettiger et al. 2013).

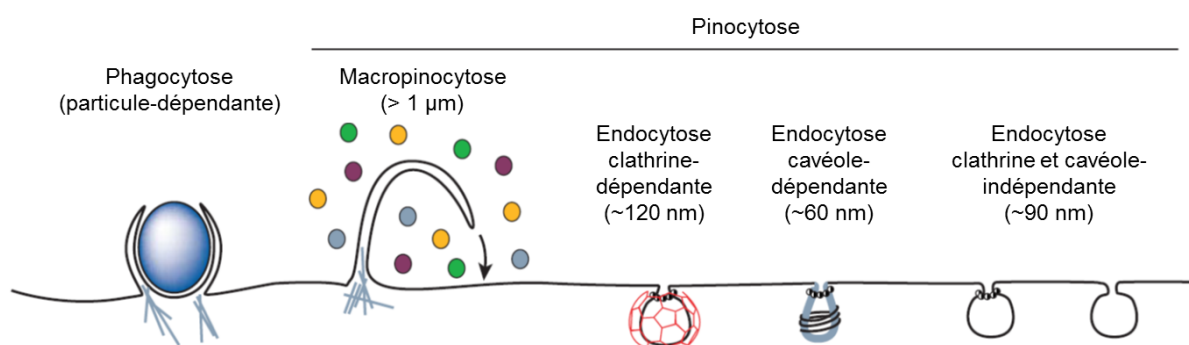


Figure 9 : Les différentes voies d'internalisation par endocytose
(Conner and Schmid 2003)

La phagocytose est la voie d'internalisation des NP la mieux documentée. La phagocytose est effectuée principalement par les cellules spécialisées du système immunitaire (monocytes, macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) et permet d'éliminer les corps étrangers et les débris cellulaires de l'organisme à l'aide de récepteurs et de l'actine. Les vésicules intracellulaires nouvellement formées, nommées phagosomes, vont fusionner avec les lysosomes contenant des enzymes digestives et un pH acide pour être digérées et dégrader le matériel phagocyté. Bien que la phagocytose soit généralement décrite comme

étant impliquée dans l'élimination de grosses particules (>500 nm), de nombreuses études suggèrent une internalisation cellulaire de particules plus petites par cette voie, notamment des NP (Franca et al. 2011; Lunov et al. 2011). Une étude parue en 2008 a par ailleurs montré que la phagocytose était impliquée dans l'accumulation de particules atmosphériques de 120 nm de diamètre dans des cellules épithéliales et des macrophages (Saxena et al. 2008).

Une autre voie d'internalisation des NP est la pinocytose. Les petites particules de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres sont généralement internalisées dans les cellules via la voie de la pinocytose, survenant dans quasiment tous les types cellulaires. La pinocytose est un processus d'internalisation de fluides et de solutés extracellulaires par invagination de la membrane plasmique donnant lieu à la formation de vésicules intracellulaires de 0,5 µm à 5 µm de diamètre. La voie de la pinocytose est divisée en 4 mécanismes : la macropinocytose, l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose cavéole-dépendante et l'endocytose clathrine et cavéole indépendante (Conner and Schmid 2003). La macropinocytose, est impliquée dans l'internalisation non spécifique des plus grosses particules (dont la taille est supérieure à 1 µm) ou encore d'agrégats de particules. Les particules avec une taille de 120 à 150 nm sont principalement internalisées par des vésicules à clathrine qui fusionneront avec un endosome puis par la suite, avec un lysosome (Chithrani et al. 2006). La limite supérieure de taille pour les particules pénétrant dans la cellule par cette voie serait de 200 nm (Rejman et al. 2004). L'endocytose cavéole-dépendante permet la formation d'une vésicule, appelée cavéole, de 50 à 80 nm de diamètre, coatée avec la cavéoline-1. Elle constitue une voie d'internalisation majoritaire du côté basolatéral des cellules endothéliales (Conner and Schmid 2003). Les petites particules semblent être transportées par cette voie (Gratton et al. 2008). Il a également été montré, dans de très rares cas, que de plus grosses particules (> 500 nm) pouvaient emprunter cette voie d'endocytose (Rejman et al. 2004). Plus récemment, d'autres voies d'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline ont été décrites et, bien que peu comprises encore, pourraient contribuer à l'internalisation des NP dans les cellules (Kettiger et al. 2013). L'étude d'Hussain *et al.* suggère une internalisation des NP de TiO₂ dans des cellules épithéliales bronchiques par un processus de macropinocytose (Hussain et al. 2009a). En revanche, une autre étude menée sur des cellules épithéliales humaines a montré que les NP de TiO₂ seraient principalement internalisées dans les cellules via un mécanisme d'endocytose clathrine-dépendante (Singh et al. 2007). De plus, Thurn et ses collaborateurs ont montré que des NP de TiO₂ (6 nm) étaient internalisées dans des cellules provenant d'une lignée cancéreuse

humaine par trois des mécanismes d'endocytose décrits ci-dessus (macropinocytose, endocytose clathrine-dépendante et endocytose cavéole-dépendante) (Thurn et al. 2011).

En plus des processus d'endocytose, les NP peuvent également pénétrer dans les cellules de façon passive : par diffusion ou via des pores membranaires. En effet, il a été rapporté que des NP de silice d'une taille de 15 à 200 nm de diamètre pouvaient être transloquées à travers la membrane plasmique par un mécanisme passif (Le Bihan et al. 2009). De plus, il a été montré que des petites particules de 2 nm pouvaient être internalisées dans des érythrocytes de façon passive (Wang et al. 2012).

Les caractéristiques physico-chimiques des NP, comme leur taille, leur forme, leur charge ou leur chimie de surface influencent très fortement le mécanisme de leur internalisation dans les cellules. Ceci est plus largement discuté, dans un paragraphe spécifique, un peu plus loin dans cette thèse (cf. paragraphe 1.1.3.6). En plus d'une influence des propriétés physico-chimiques des NP sur leur internalisation cellulaire, le type cellulaire joue également un rôle important. En effet, des NP aux propriétés physico-chimiques identiques peuvent être internalisées de façon différente selon les types cellulaires (dos Santos et al. 2011). Par exemple, il a été démontré que la phagocytose et la macropinocytose étaient absentes dans les cellules endothéliales des capillaires du cerveau (Pardridge 1995). De même, les globules rouges sont maintenant connus pour être incapables d'effectuer de l'endocytose. En outre, des études plus récentes ont révélé un impact de la phase du cycle cellulaire sur la capacité des cellules à internaliser les NP (Kim et al. 2012).

Une fois internalisées dans la cellule, les NP vont être dirigées vers la voie endosomale/lysosomale dans la plupart des cas. De façon plus précise, les vésicules intracellulaires contenant les NP vont fusionner avec des endosomes précoces puis tardifs pour ensuite fusionner avec des lysosomes contenant des enzymes de dégradation. Cependant, il arrive que des NP (notamment dans le cas de particules basiques ou chargées positivement) soient capables de « s'échapper » des endosomes via l'effet « éponge à protons ». En effet, une fois dans l'endosome, la NP peut piéger les protons H^+ rentrant dans celui-ci via une pompe ATPase pour l'acidification de l'endosome. Ce phénomène a pour conséquence la rétention d'ions Cl^- et de molécules d'eau (un ion Cl^- et une molécule d'eau entrant à chaque

entrée d'un proton H^+ afin de maintenir l'électroneutralité) et donc le gonflement osmotique de la vésicule, qui finit par se rompre, relâchant ainsi son matériel dans le cytosol (Nel et al. 2009). Les NP se retrouvant dans le cytosol peuvent alors interagir avec les organites intracellulaires comme la mitochondrie et le noyau et induire des effets cytotoxiques (Rothen-Rutishauser et al. 2007). Ces effets potentiellement toxiques pour une cellule saine peuvent cependant être bénéfiques dans le cas de la nanomédecine. En effet, un échappement de la NP de la voie endosomale peut être souhaitable pour délivrer le médicament à un compartiment cellulaire spécifique où il pourra agir.

En conclusion, les NP sont capables de rentrer dans les cellules et d'y induire potentiellement des effets cytotoxiques. Les NP peuvent emprunter un ou plusieurs mécanismes d'internalisation cellulaire, ceci dépendant fortement des caractéristiques physico-chimiques des NP et du type cellulaire exposé.

1.1.3.3. Toxicité pulmonaire des NP de TiO_2

Suite à une exposition pulmonaire, les NP de TiO_2 peuvent induire des effets toxiques à un niveau local, c'est-à-dire au niveau des poumons mais peuvent aussi avoir des effets extra-pulmonaires expliqués, en partie, par la distribution systémique de ces NP. Les paragraphes suivants ont pour but de décrire les effets pulmonaires des NP de TiO_2 actuellement rapportés dans la littérature ; les effets extra-pulmonaires sont décrits plus loin. Les données concernant la toxicité pulmonaire des NP sont principalement venues des études épidémiologiques sur les particules ultrafines de la pollution atmosphérique mais aussi d'études expérimentales sur la toxicité des NP *in vitro* et dans des modèles animaux.

1.1.3.3.1. Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques sur la toxicité de la pollution atmosphérique révèlent une association entre l'exposition aux particules de la pollution atmosphérique et des effets délétères sur les poumons comme sur d'autres organes (Oberdorster et al. 2005). Cependant, il

est nécessaire de noter que dans la plupart de ces études épidémiologiques, la composante nanoparticulaire n'a jamais été spécifiquement mesurée, et il n'a donc pas été possible d'évaluer les effets spécifiques des particules ultrafines et de les comparer à ceux des plus larges particules. De plus, et pour la même raison, l'effet des particules ultrafines de composition chimique donnée n'a pu être évaluée dans ce type d'étude.

Il existe cependant un nombre, relativement faible, d'études épidémiologiques concernant les effets du TiO₂ sur des travailleurs d'usine de fabrication de TiO₂. Les résultats d'une de ces études montrent un dépôt de particules de TiO₂ (sans indication sur la taille des particules) dans les poumons des travailleurs, associé à une fibrose pulmonaire (Elo et al. 1972). Une deuxième étude menée sur 209 travailleurs a révélé un épaississement pleural associé à une diminution de la capacité ventilatoire chez 17% des sujets (Garabrant et al. 1987). Par ailleurs, il n'a pas été identifié d'association entre l'exposition aux particules de TiO₂ et le risque de cancer du poumon dans les études menées chez les travailleurs exposés (Boffetta et al. 2001; Boffetta et al. 2004; Fryzek et al. 2003). Malheureusement, aucune de ces études n'évalue la taille des particules auxquelles les travailleurs sont exposés, ce qui ne présente ainsi que peu d'intérêt pour l'évaluation de la toxicité des NP de TiO₂.

Ainsi, bien que les données épidémiologiques concernant les effets des particules micrométriques de TiO₂ n'aient pas clairement identifié d'effets délétères chez l'Homme, aucune étude épidémiologique n'existe à ce jour quant aux effets des NP de TiO₂ seules. Le manque de données épidémiologiques humaines sur les NP de TiO₂ pourrait s'expliquer en partie par le caractère relativement récent de la nanotoxicologie.

1.1.3.3.2. Etudes expérimentales

Les études expérimentales sur la toxicité pulmonaire des NP de TiO₂ *in vivo* regroupent celles utilisant des modèles de souris ou de rats exposés aux NP par inhalation, instillation intratrachéale ou bien oro-pharyngée. La majorité de ces études a principalement fait état d'une inflammation pulmonaire, associée à des phénomènes de remodelage pulmonaire (Shi et al. 2013).

Le développement d'une fibrose pulmonaire après exposition aux NP de TiO₂ est un des phénomènes les plus décrits. La fibrose pulmonaire se caractérise par la formation et

l'accumulation de tissu conjonctif fibreux composé de collagène, via une accumulation de myofibroblastes pulmonaires et un remodelage de la matrice extracellulaire. L'étude de Churg *et al.*, datant de 1999 est une des premières à mettre en évidence le caractère pro-fibrosant d'une exposition aux NP de TiO₂. Les résultats de cette étude indiquent une augmentation de l'expression des gènes codant pour le pro-collagène, le TGF- β et des facteurs de croissance dans des explants de trachée de rats exposés à des NP de TiO₂ suggérant ainsi une réponse pro-fibrosante (Churg et al. 1999). Par ailleurs, il a été montré que des rats exposés à des NP de TiO₂ développaient une importante réponse inflammatoire associée à des lésions pulmonaires avec une prolifération des cellules épithéliales, un épaississement des parois alvéolaires et une accumulation des particules au niveau de l'interstitium (Bermudez et al. 2002; Bermudez et al. 2004). Cette fibrose, induite par les NP de TiO₂, peut être réversible. En effet, une étude menée chez des rats a démontré qu'une fibrose était induite 6 mois après une exposition à des NP de TiO₂ de façon chronique (6h/jour, 5jours/semaine pendant 3 mois). Cependant, cette fibrose n'était plus détectable 1 an après la dernière exposition (Baggs et al. 1997). Néanmoins, des résultats différents ont été publiés en 2011 ; l'étude de Morimoto également menée chez le rat exposé par inhalation à des NP de TiO₂ n'a pas permis de mettre en évidence un développement de fibrose pulmonaire : aucune modification de l'expression des gènes pro-fibrosants MMP-2 (*matrix metalloproteinase 2*), TIMP-2 (*tissue inhibitor matrix proteinase 2*) et collagène I n'a été observée (Morimoto et al. 2011). Cette différence de résultats pourrait s'expliquer par le fait que cette dernière étude était basée sur une exposition de 4 semaines seulement, dite aiguë (Shi et al. 2013), probablement pas suffisante pour observer ces phénomènes de remodelage pulmonaire.

L'emphysème pulmonaire est un autre exemple de remodelage tissulaire pathologique. Il est caractérisé par la destruction des parois alvéolaires et conduit à une réduction de la capacité ventilatoire. L'exposition pulmonaire à des NP de TiO₂ peut induire des dommages pulmonaires de type emphysème (Chen et al. 2006). En effet, les travaux de Chen *et al.*, ont mis en évidence des modifications histologiques dans les poumons de souris exposées par instillation intratrachéale d'une dose unique de 100 μ g de NP de TiO₂ : dégradation des septa alvéolaires, lésions de l'épithélium alvéolaire et prolifération et apoptose des pneumocytes de type II. De plus, l'expression génique de plusieurs médiateurs de l'inflammation, dont PlGF (*placental growth factor*) est augmentée chez les souris exposées. Cependant, une étude récente présente des résultats différents : l'installation intratrachéale d'une même dose de NP de TiO₂ chez le rat n'induit pas d'emphysème pulmonaire et n'aggrave pas non plus un

emphysème déjà établi (Roulet et al. 2012). Néanmoins, et concernant l'exacerbation de maladies préexistantes, une étude d'Hussain parue en 2011 a démontré qu'une dose plus faible (0,8 mg/kg) de NP de TiO₂ administrées par voie oropharyngée pouvait aggraver l'inflammation pulmonaire et l'asthme dans un modèle murin d'asthme induit par le diisocyanate de toluène (Hussain et al. 2011).

Les études expérimentales basées sur l'exposition pulmonaire à des NP de TiO₂ suggèrent aussi un potentiel carcinogène de ces particules. Des travaux menés *in vivo* montrent que de fortes concentrations de particules de TiO₂ (<2,5 µm ; 250 mg/m³ pendant 2 ans) mais aussi de NP de TiO₂ (<100 nm ; 10 mg/m³ pendant 2 ans) peuvent induire des cancers de l'appareil respiratoire chez des rats exposés (Borm et al. 2004; Dankovic et al. 2007) . Plusieurs études d'exposition chronique à des NP de TiO₂ par inhalation ont montré que ces NP pouvaient induire des adénomes bronchiques mais aussi des carcinomes (Lee et al. 1985; Trochimowicz et al. 1988). Des résultats similaires ont été observés dans l'étude de Mohr *et al* où des rats étaient instillés avec des NP de TiO₂ de différents types et à différentes doses. L'incidence des tumeurs pulmonaires était significativement plus élevée chez les rats exposés que chez les rats contrôles (Mohr et al. 2006). Afin d'évaluer les risques pour la santé humaine d'une exposition, au travail, aux NP de TiO₂, des extrapolations à partir des données obtenues chez le rongeur ont été réalisées (Dankovic et al. 2007; Kuempel et al. 2006). Ces estimations indiquent que la valeur seuil à laquelle est associé un risque de 0.1 % de développer un cancer du poumon se situerait entre 0.07 et 0.3 mg/m³. Basée sur ces résultats, l'Institut National des Etats-Unis pour la sécurité et la santé au travail (NIOSH - *National institute of occupational safety and health*) a recommandé une valeur limite d'exposition de 0,3 mg/m³ pour les NP de TiO₂ (NIOSH 2011). Cependant, et bien qu'utiles pour prédire les risques des NP sur la santé humaine, ces études ne sont que les résultats de modèles d'extrapolation et ne peuvent remplacer les études épidémiologiques, pas assez nombreuses et très incomplètes à ce jour sur ce sujet.

En conclusion, les NP de TiO₂ présentent des risques potentiels pour la santé humaine, puisque, expérimentalement, elles induisent principalement une réponse inflammatoire et des phénomènes de remodelage pulmonaire, comme la fibrose ou encore le développement de tumeurs. A partir de ces résultats, les particules de TiO₂, incluant la forme nanoparticulaire, ont été reconnues comme potentiellement cancérigènes pour l'Homme et donc classées dans

le groupe 2B par le Centre International de Recherche sur le Cancer (Baan 2007). Toutefois, il est important de souligner que toutes les NP de TiO₂ n'induisent pas systématiquement ce type de réponses pulmonaires, dépendant notamment de facteurs différents, qui ne sont pas tous encore connus à ce jour. Cette question mérite largement de plus amples études sur le sujet, afin de mieux comprendre la toxicité des NP de TiO₂.

1.1.3.4. Toxicité extra-pulmonaire des NP de TiO₂

En plus des effets locaux des NP de TiO₂, celles-ci peuvent également avoir un effet sur d'autres organes que les poumons via leur distribution dans l'organisme. En effet, après exposition par voie pulmonaire, les NP se retrouvent dans les poumons, peuvent être transloquées et ainsi accéder au système circulatoire pour atteindre des sites extra pulmonaires où elles pourront exercer une toxicité. Différentes études réalisées *in vivo* sur des rats exposés aux NP de TiO₂ par inhalation rapportent des dysfonctions microvasculaires (notamment une diminution de la capacité vasodilatatrice de l'endothélium) au niveau des muscles squelettiques mais aussi au niveau du muscle cardiaque (LeBlanc et al. 2009; Nurkiewicz et al. 2008). De plus, une installation intratrachéale de NP de TiO₂ peut causer une dyslipidémie et accélérer le développement de l'athérosclérose et la rupture des plaques d'athérome dans un modèle murin d'athérosclérose (Chen et al. 2013b; Hu et al. 2010). Plus récemment, Huang *et al* ont montré qu'une exposition répétée à des NP de TiO₂ par instillation intratrachéale pouvait induire une fibrose rénale chez la souris (Huang et al. 2015). Par ailleurs, il a également été montré, qu'après instillation intranasale, les NP de TiO₂ pouvaient être absorbées par la muqueuse nasale et atteindre le cerveau, directement via le nerf olfactif, afférent à la muqueuse nasale, ou indirectement via la circulation sanguine et le passage de la barrière hémato-encéphalique (Czajka et al. 2015). Wang et ses collaborateurs ont montré que ces NP étaient capables de modifier de façon conséquente, dans le cerveau, le relargage et le métabolisme de neurotransmetteurs monoaminergiques (Wang et al. 2007), impliqués dans de nombreux syndromes neurologiques (Kurian et al. 2011). Les effets des NP de TiO₂ sur l'organisme ne se réduisent donc pas simplement au niveau pulmonaire, mais semblent pouvoir affecter d'autres organes.

1.1.3.5. Mécanismes moléculaires de la toxicité des NP

Plusieurs mécanismes biologiques ont été décrits comme potentiellement responsables de la toxicité des NP. La présence d'un stress oxydant et l'induction d'une réponse inflammatoire, généralement liées, sont les deux mécanismes les plus souvent évoqués. Cependant, des données plus récentes de la littérature suggèrent également l'importance de la génotoxicité, mais aussi de la corona protéique, dans la toxicité des NP.

1.1.3.5.1. Stress oxydant

La génération d'un stress oxydant résulte du déséquilibre entre la production d'oxydants (notamment des espèces réactives de l'oxygène, ROS) et celle d'antioxydants, en faveur des oxydants. Le stress oxydant est décrit comme le mécanisme majeur sous-jacent à la toxicité des NP. Les ROS peuvent être générées par la cellule en réponse à une agression, comme une exposition à des NP, mais peuvent aussi provenir des NP elles-mêmes. En effet, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, certaines NP sont capables de produire des ROS de façon intrinsèque (Manke et al. 2013) et ainsi participer au stress oxydant. En plus d'être potentiellement oxydantes de par leur nature, les NP interagissant avec les cellules peuvent également induire la production intracellulaire de ROS via la respiration mitochondriale et l'activation des systèmes enzymatiques impliqués dans leur production. En effet, plusieurs études *in vitro* ont révélé la présence d'un stress oxydant dans différents types cellulaires exposés à des NP de TiO_2 : cellules épithéliales bronchiques (Ekstrand-Hammarstrom et al. 2012; Tang et al. 2013), macrophages alvéolaires (Hamilton et al. 2009), fibroblastes (Periasamy et al. 2015). Ce stress oxydant est caractérisé par une surproduction de ROS intracellulaires, notamment d' H_2O_2 et de NO (Gurr et al. 2005), avec réduction des systèmes de défense contre les ROS, notamment réduction des superoxydes dismutases et du glutathion réduit (Jin et al. 2008; Xue et al. 2010), et peroxydation lipidique (Hamilton et al. 2009; Hussain et al. 2010). Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* où une production de ROS était observée dans les poumons suite à l'exposition pulmonaire à des NP de TiO_2 (Sun et al. 2012b). Il est cependant important de noter que toutes les NP n'induisent pas de stress oxydant. Par exemple, une étude de Vales *et al* a montré qu'une exposition

chronique *in vitro* à des NP de TiO₂ (de 1 à 20 µg/ml jusqu'à 4 semaines) n'induisait pas de production de ROS dans une lignée épithéliale bronchique humaine (Vales et al. 2015).

Le stress oxydant induit par les NP peut avoir plusieurs conséquences : l'induction d'une inflammation, une génotoxicité mais aussi une mortalité cellulaire. Les effets pro-oxydants des NP conduisent en effet à l'activation de certaines voies de signalisation et de facteurs de transcription induisant diverses réponses cellulaires. Parmi les différents facteurs de transcription régulés par la balance redox, on trouve NF-κB, AP-1, et MAPK, qui contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaires, l'apoptose, et l'inflammation et dont les modulations peuvent être impliquées dans le développement de fibrose ou de cancers (Manke et al. 2013). Lorsque la cellule ne peut plus faire face aux dommages induits par le stress oxydant, une mortalité cellulaire peut survenir. Les travaux de Xue et ses collaborateurs montrent en effet que des NP de TiO₂ peuvent induire la production de ROS et des dommages cellulaires sous irradiation UVA dans des cellules HaCaT. Cette production de ROS conduit à un stress oxydatif dans ces cellules, et à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (Xue et al. 2010). Un prétraitement par la N-acétylcystéine (NAC), un antioxydant, prévient le stress oxydant et surtout l'apoptose induite par les NP (Xue et al. 2011).

1.1.3.5.2. Inflammation

L'induction d'une réponse inflammatoire est un phénomène fréquemment décrit suite à l'exposition à des NP en général, et de NP de TiO₂ en particulier. Cette inflammation se manifeste généralement précocement et est caractérisée par un afflux de cellules inflammatoires, pouvant être transitoire ou persistant. En effet, une augmentation du nombre de cellules inflammatoires (notamment macrophages et neutrophiles) dans les lavages broncho alvéolaires de souris exposées à des NP de TiO₂, est observée 4h à 6h après exposition et peut être retrouvée jusqu'à 1 mois après l'arrêt de l'exposition (Baisch et al. 2014; Noel et al. 2013; Warheit et al. 2007). Le recrutement de cellules inflammatoires s'accompagne d'une production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF-α, CXCL1, IL-1β, IL-6, ou IL-8, qui vont participer à l'entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire (Baisch et al. 2014; Larsen et al. 2010; Moon et al. 2010; Yazdi et al. 2010).

Comme vu précédemment, l'induction d'une réponse inflammatoire peut également résulter d'un stress oxydant. L'étude de Sun *et al.* met en évidence une activation du facteur de transcription NF- κ B et une production subséquente de cytokines associée à une production de ROS accrue accompagnée d'une peroxydation lipidique dans les poumons de souris exposées à des NP de TiO₂ (Sun et al. 2012a). Ces résultats suggèrent que l'exposition aux NP de TiO₂ génèrerait un stress oxydant responsable de l'induction d'une réponse inflammatoire dans les poumons des souris exposées. De plus, dans l'étude d'Hussain *et al.*, des NP de TiO₂ induisent un stress oxydant à l'origine d'une inflammation dans des cellules épithéliales bronchiques (Hussain et al. 2009a). En effet, la catalase, un antioxydant, prévient l'inflammation induite par ces NP. De plus, *in vivo*, l'administration de NAC chez des rats exposés à des NP de TiO₂ prévient la production d'IL-6 et de TNF- α (El-Kirdasy et al. 2014).

1.1.3.5.3. Génotoxicité

La génotoxicité d'une substance se définit comme sa capacité à induire des lésions de l'ADN se traduisant par un dysfonctionnement cellulaire pouvant conduire à des cancers. Le potentiel génotoxique des NP a récemment été décrit (Magdolenova et al. 2014; Xie et al. 2011). Les effets génotoxiques des NP peuvent résulter d'une génotoxicité directe, via une interaction directe de la particule avec la cellule, ou bien d'une génotoxicité indirecte, via une surproduction de ROS. Des études *in vivo* et *in vitro*, dans différents types cellulaires, ont montré que des NP de TiO₂ pouvaient induire la formation d'adduits à l'ADN, de cassures simples brins, de fragmentations de l'ADN et de micronoyaux (Chen et al. 2014b; Chen et al. 2014c; Kansara et al. 2015). Par ailleurs, l'étude de Jugan *et al.* démontre qu'en plus d'entraîner des lésions sur l'ADN, les NP de TiO₂ peuvent réduire la capacité des cellules à réparer l'ADN en inactivant les systèmes de réparation de l'ADN (Jugan et al. 2012).

Des études contradictoires n'ont, au contraire, pas montré d'effets génotoxiques des NP de TiO₂, que cela soit *in vivo* ou *in vitro* (Landsiedel et al. 2010b; Lindberg et al. 2012; Naya et al. 2012).

La génotoxicité peut être médiée par le stress oxydant. En effet, les ROS peuvent interagir avec des macromolécules cellulaires, comme l'ADN, et les endommager, augmentant ainsi le risque de cancers. Une étude récente comparant les effets de NP d'oxydes métalliques et incluant le TiO₂, a démontré un effet génotoxique de ces NP, médié par la

production de ROS et caractérisé par la formation de micronoyaux et de lésions de l'ADN *in vivo* (Song et al. 2012).

1.1.3.5.4. Interaction avec la corona protéique

Lorsqu'elles entrent en contact avec un milieu biologique, les NP peuvent interagir avec des biomolécules telles que des protéines et des lipides et les adsorber à leur surface. La formation de ces complexes NP-protéines est communément désignée sous le nom de « corona protéique ». L'adsorption et la désorption de biomolécules à la surface des NP est un phénomène dynamique, intervenant au site d'entrée des NP dans l'organisme et qui dépend des caractéristiques physico-chimiques des NP et de la nature de l'environnement physiologique (sang, liquide interstitiel, cytosol...) (Lundqvist et al. 2008). La composition de cette corona protéique peut modifier l'état conformationnel des NP, notamment leur degré d'agglomération, mais aussi leur réactivité (Nel et al. 2009), et joue en conséquence un rôle déterminant dans la biodistribution des NP, dans les tissus et les cellules cibles, mais aussi dans leur toxicité. De plus, les protéines adsorbées à la surface des NP peuvent elles aussi être modifiées et altérées. Il n'existe pas de corona protéique « universelle » et commune à toutes les NP ; celle-ci est complexe, spécifique à chaque NP et est dépendante de nombreux facteurs.

La corona protéique la plus décrite est celle se formant dans le plasma sanguin. Dans le plasma sanguin, la majorité des biomolécules adsorbées à la surface des NP sont des protéines. L'adsorption des protéines à la surface des NP est gouvernée par les affinités de liaison entre NP et protéines mais aussi entre les protéines entre elles. On distingue alors deux types de corona protéique : les protéines adsorbées avec une forte affinité et ne se désorbant pas facilement forment la « *hard-corona* » tandis que les protéines adsorbées avec une faible affinité et se désorbant rapidement forment la « *soft-corona* ». Ces deux types de corona protéique peuvent aussi être définis selon leur interaction directe ou non avec la NP : les protéines de la « *hard corona* » interagiraient directement avec la surface de la NP alors que celles de la « *soft corona* » interagiraient avec les protéines de la « *hard corona* » via des liaisons faibles protéines-protéines (Walkey and Chan 2012). Plusieurs études de la littérature se sont intéressées à la composition de la corona protéique de différentes NP aux modifications de surface variées en utilisant différentes méthodes. Un résumé de ces études

réalisé par Aggarwal *et al.* montre que l'albumine, des immunoglobulines G, le fibrinogène et des apolipoprotéines sont présents à la surface de toutes les NP étudiées (Aggarwal et al. 2009). Ceci peut aisément s'expliquer par le fait que ces protéines sont présentes en grandes quantités dans le plasma sanguin. Il a ainsi été avancé que ces protéines pouvaient faire initialement partie de la corona protéique des NP puis être remplacées par la suite par des protéines ayant une affinité de liaison plus importante pour la surface des NP (Rahman et al. 2013), soulignant ainsi la dynamique de la corona protéique.

La nature de l'interaction entre NP et protéines peut modifier la structure et donc la fonction des protéines adsorbées, affectant ainsi la bioréactivité des NP. Dans la plupart des cas, ces changements conformationnels des protéines sont irréversibles après désorption (Rahman et al. 2013). Par exemple, les changements conformationnels de la transferrine, une protéine de transport du fer, ne sont pas rétablis après sa désorption d'une NP d'oxyde de fer (Rahman et al. 2013). De même, il a été montré que les NP de TiO₂ pouvaient induire des changements conformationnels de la tubuline, une protéine essentielle du cytosquelette, réduisant ainsi sa polymérisation (Gheshlaghi et al. 2008).

En résumé, la corona protéique semble être un mécanisme clé dans la modulation des effets biologiques des NP.

Prises dans leur ensemble, les données présentées dans les paragraphes précédents suggèrent un rôle important des réponses oxydante, inflammatoire, et génotoxique, généralement interdépendantes, mais aussi une importance de la corona protéique dans les conséquences pathologiques observées lors de l'exposition à des NP (Figure 10). Toutefois, ces mécanismes ne sont pas toujours observés en réponse aux NP et ne sont probablement pas les seuls à intervenir dans la toxicité des NP. De nombreuses études sont encore nécessaires pour comprendre complètement les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse biologique aux NP.

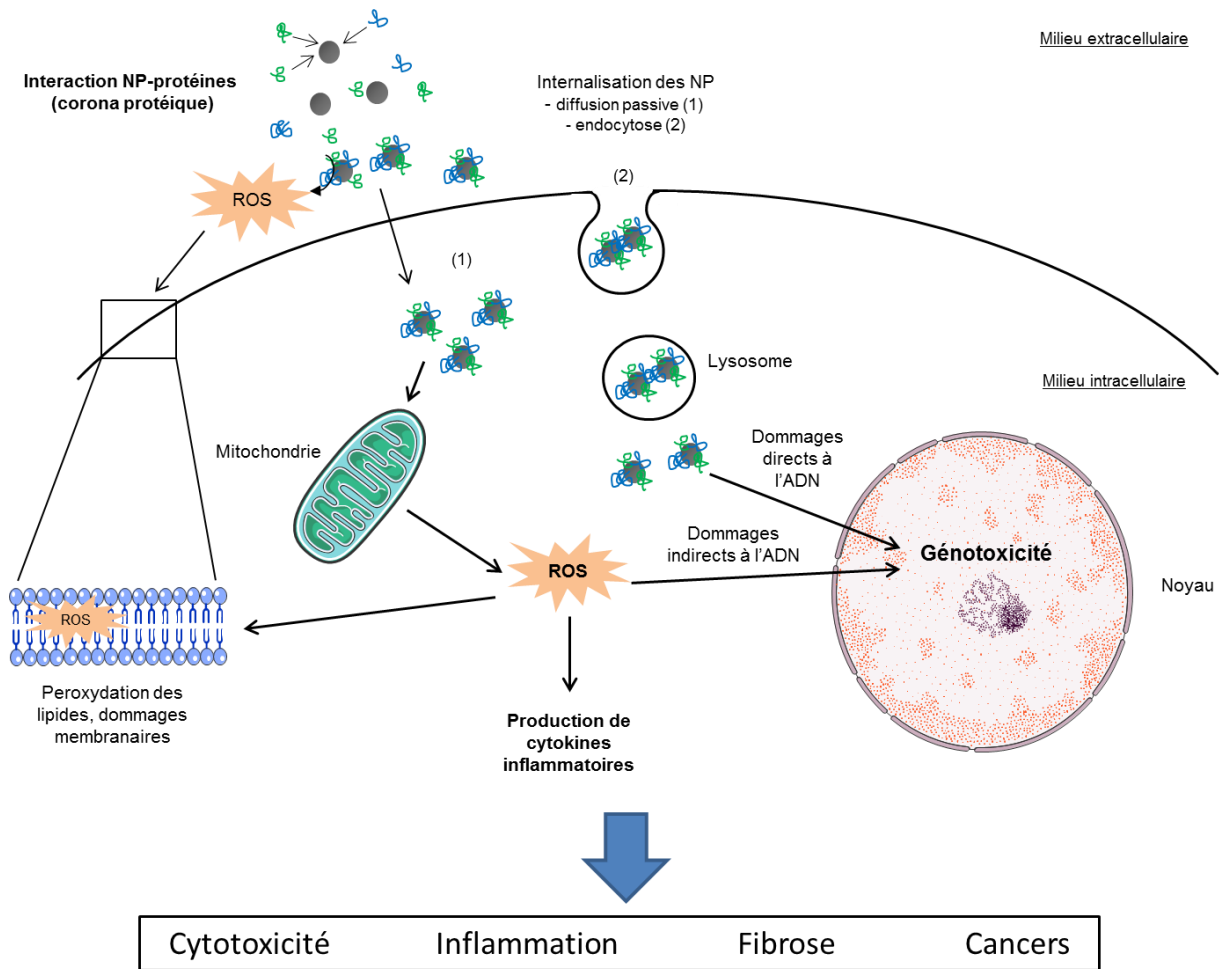


Figure 10 : Mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité des NP

1.1.3.6. Impact des caractéristiques physico-chimiques des NP sur leurs effets biologiques

Comme évoqué précédemment, il n'existe pas de réponse de l'organisme typique et commune à toutes les NP, que ce soit en termes de toxicité de façon générale ou bien en termes de mécanismes impliqués dans ces effets. Les études nanotoxicologiques menées à ce jour suggèrent des corrélations entre les différentes propriétés physico-chimiques des NP et les résultats toxicologiques observés suite à l'exposition cellulaire ou tissulaire à ces NP. Initialement c'est le facteur taille des NP qui a été exploré, mais les études actuellement disponibles dans la littérature suggèrent que de nombreux autres facteurs sont potentiellement déterminants dans la toxicité des NP, tels que la forme, la composition chimique, la structure

cristalline ou les propriétés de surface. Néanmoins, cette liste ne se veut pas exhaustive. Le Tableau 1 liste les principales caractéristiques physico-chimiques des NP influant sur leurs effets biologiques et toxicologiques. Seuls les paramètres les plus décrits dans la littérature sont détaillés dans les paragraphes suivants.

Taille (primaire et diamètre hydrodynamique)	<p>Ces propriétés peuvent changer :</p> <ul style="list-style-type: none"> - avec la méthode de production, de préparation ou de stockage des NP - lorsque les NP sont introduites dans un milieu physiologique
Distribution de taille	
Forme	
Etat d'agglomération/agrégation	
Propriétés de surface	
Aire (porosité)	
Charge	
Réactivité	
Chimie (revêtements, contaminants)	
Défauts	
Solubilité (lipides, eau, <i>in vivo</i>)	
Cristallinité	

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des NP pouvant influencer sur leur toxicité

(Oberdorster 2010)

1.1.3.6.1. La taille

La taille, mais aussi l'état d'agglomération des particules jouent un rôle fondamental dans leur toxicité. Depuis les vingt dernières années, de nombreuses études se sont en effet intéressées à comparer les effets des NP à des particules de même composition chimique mais de taille plus importante et ont démontré que les NP induisaient une plus grande toxicité que leur homologue de plus grande taille (Buzea et al. 2007). Cela est également vrai pour les NP de TiO₂ : l'influence de la taille dans la toxicité des NP de TiO₂ a été démontrée de nombreuses fois, et semble être vérifiée quelles que soit la structure cristalline ou la forme de la NP utilisée et quel que soit le modèle utilisé (Johnston et al. 2009). L'inhalation de particules de TiO₂ de même structure cristalline et de tailles différentes (20 nm et 250 nm)

chez le rat, a montré que les NP induisaient une réponse inflammatoire pulmonaire plus importante que les particules de 250 nm de diamètre. Des observations réalisées jusqu'à un an après la fin de l'exposition ont montré que les NP présentaient une translocation vers l'interstitium pulmonaire ainsi qu'une persistance pulmonaire plus importante, une prolifération plus importante des cellules de type II ainsi qu'un défaut de fonction des macrophages alvéolaires (Oberdorster et al. 1994). Une étude de Gurr *et al* a également montré que des NP de TiO₂ de taille 10 et 20 nm induisaient des dommages oxydatifs de l'ADN dans des cellules épithéliales bronchiques, effets non retrouvés avec des particules micrométriques (200 nm) de même composition (Gurr et al. 2005). Plus récemment, il a été montré *in vivo* chez le rat que plus les particules étaient petites, plus la réponse inflammatoire pulmonaire était importante (Kobayashi et al. 2009). L'impact de la taille des NP sur leurs effets biologiques pourrait s'expliquer en partie par une différence dans leur clairance et/ou leur internalisation cellulaire, mécanismes dépendant eux aussi des caractéristiques physico-chimiques des NP (Shang et al. 2014).

La majorité des études évaluant l'effet de la taille des NP sur leur potentiel toxique suggèrent que les NP semblent être plus toxiques que les particules plus grosses. Cependant, la taille des NP en général, et des NP de TiO₂ en particulier, ne conditionne pas forcément une toxicité. Autrement dit, le fait que la particule soit de plus en plus petite ne conditionne pas obligatoirement une toxicité de plus en plus importante. Ainsi, il a été montré que des NP d'or de taille de 3, 5, 50 ou 100 nm ne causaient aucune toxicité chez des souris exposées par injection de façon hebdomadaire tandis que des NP d'or de 8, 12, 17 et 37 nm induisaient une sévère toxicité avec observation de lésions pulmonaires, hépatiques et spléniques et une mortalité dans les 3 semaines suivant la première injection (Chen et al. 2009b). De plus, une étude récente a rapporté que la taille des particules de TiO₂ (de 6 nm à 1 µm) n'affectait pas la clairance pulmonaire ni la toxicocinétique des particules (Shinohara et al. 2015).

En plus de la taille primaire des NP, l'état d'agglomération de celles-ci est également un paramètre clé dans la toxicité des NP. Les NP peuvent s'agglomérer ou s'agréger pour former des structures de plus grandes tailles. Ainsi, l'exposition aux NP ne se fait généralement pas sous la forme nanométrique, mais est associée à la taille des agglomérats/agrégats. La formation et la taille de ces structures semble être un critère important dans l'évaluation de la toxicité potentielle des NP. Grassian *et al.* ont montré que des NP de 21 nm de diamètre étaient significativement plus toxiques que des NP de 5 nm de diamètre que ce soit après inhalation ou instillation intranasale chez la souris (Grassian et al.

2007). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que l'état d'agglomération des NP pourrait être responsable de cette différence de toxicité. En effet, les auteurs ont montré que les particules de 21 nm formaient des agglomérats moins denses que ceux formés par les NP de 5 nm, plus susceptibles de se « dés-agglomérer » grâce aux interactions plus faibles maintenant les particules ensemble. En conséquence, les particules, plus grosses, de 21 nm seront finalement disponibles sous des structures plus petites que celles de 5 nm et induiront une réponse toxique plus importante. Par ailleurs, les auteurs ont montré que les agrégats formés étaient plus gros lorsque les NP étaient administrées par inhalation que par instillation intranasale, ce qui pourrait expliquer la plus grande toxicité observée suite à l'exposition par instillation. Plus récemment, il a été montré que la taille des agglomérats influençait le type de réponse biologique induit après exposition. Ainsi, une étude, parue en 2012, a comparé les effets d'une inhalation de larges agglomérats (>100 nm) de NP de TiO₂ de 5 nm chez le rat avec ceux d'une inhalation de plus petits agglomérats (<100 nm) composé des mêmes NP. Les agglomérats larges induisent une inflammation modérée avec augmentation du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) tandis que les petits agglomérats n'induisent pas d'inflammation mais un stress oxydant (Noel et al. 2012).

La capacité des NP à s'agréger et donc à induire des réponses différentes selon la taille de ces structures a conduit les chercheurs à s'affranchir de ce phénomène en utilisant des méthodes de dispersion des NP (sonication, ajouts de dispersants dans la suspension de NP ...), conduisant cependant à la question de la pertinence de ces études pour l'exposition humaine.

Ainsi, si la taille des NP peut avoir une influence sur leurs effets biologiques, il est également important de prendre en compte la formation d'agglomérats/agrégats, pouvant aussi avoir un impact sur les effets des NP.

1.1.3.6.2. La forme

La forme de la particule semble également jouer un rôle important dans la toxicité des NP. Hamilton *et al.* ont par exemple testé la toxicité de NP de TiO₂ de différentes formes (sphérique 60-200 nm, nanofils courts < 5 µm et nanofils longs > 15 µm) *in vitro* sur une lignée de macrophages alvéolaires murins mais aussi *in vivo* (Hamilton et al. 2009). Les

nanofils longs présentaient une toxicité bien plus élevée que les deux autres types de NP étudiés, avec une perte de l'intégrité membranaire des lysosomes conduisant au relargage dans le cytosol des enzymes lysosomales. De plus, ces nanofils induisaient une activation de l'inflammasome et une production subséquente de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages alvéolaires. Un consortium mis en place par l'Institut national des sciences de la santé des Etats-Unis (NIEHS) a récemment conduit toute une série d'études *in vitro* et *in vivo* menées dans différents laboratoires sur plusieurs types de NP, incluant des NP de TiO₂ de formes variées (sphérique et nanofil) afin d'évaluer la toxicité de ces NP sur des types cellulaires variés (Xia et al. 2013). Ces études ont conclu que seule la NP de TiO₂ sous forme de fil induit des effets biologiques : elle induit une production significative d'IL-1 β dans une lignée de monocytes/macrophages humains (lignée THP-1) et l'exposition à cette NP conduit à une élévation du nombre de neutrophiles dans les LBA de souris et de rats 1 jour après instillation intratrachéale. Aucun effet toxique n'a été observé *in vitro* pour les NP de TiO₂ de forme sphérique, et ce dans aucun des laboratoires du consortium.

1.1.3.6.3. La structure cristalline

Les effets biologiques des NP dépendent fortement de leur structure cristalline. Un des meilleurs exemples pour illustrer cela est celui des NP de TiO₂. Le TiO₂ existe majoritairement sous deux formes : l'anatase et le rutile. La majorité des études menées jusqu'à ce jour a démontré un potentiel toxique plus élevé de la forme anatase comparé à la forme rutile. Sayes *et al.* ont étudié la toxicité *in vitro* de NP de TiO₂ de taille comparable et de variété cristalline différente : anatase (10 nm), rutile (5 nm) et anatase/rutile (3 nm) dans des cellules épithéliales et des fibroblastes humains (Sayes et al. 2006). La concentration utilisée variait de 3 μ g/ml à 300 μ g/ml pour une exposition cellulaire durant jusqu'à 48h. Les résultats de cette étude ont montré que les NP anatase pouvaient être jusqu'à 100 fois plus toxiques que leur homologue de structure rutile. Les NP de forme anatase étaient également celles induisant une production de ROS, *ex vivo* et sous lumière UV, plus importante. Ces résultats suggèrent que la capacité des NP à générer des ROS, dictée par la structure cristalline de la NP, est responsable, du moins en partie, de son potentiel cytotoxique. De façon cohérente, Pan et ses collaborateurs ont trouvé que la forme anatase était plus toxique que la forme rutile (Pan et al. 2009). En effet, les NP anatase induisaient d'importantes lésions

cellulaires accompagnées des changements morphologiques comme une rupture des filaments d'actine et de la membrane plasmique. Les NP de forme rutile, bien qu'aussi internalisées dans les cellules, induisaient moins de dommages et présentaient surtout une capacité moins élevée à produire des ROS. Par ailleurs, il a également été montré que la structure cristalline des NP pouvait influencer sur le type de mort cellulaire. En effet, les NP de structure anatase induiraient une mort cellulaire par nécrose tandis que celles de structure rutile conduiraient à une apoptose induite par la production de ROS (Hussain et al. 2009b). Cependant, d'après Liu *et al*, seule une légère augmentation de la toxicité de l'exposition aux NP anatase était observée par rapport aux NP rutile et P25 (80 % anatase, 20 % rutile) (Liu et al. 2009). De plus, une étude parue en 2012 a montré que les NP de forme anatase pure étaient moins génotoxiques que les NP de forme anatase/rutile (Gerloff et al. 2012). Enfin, une étude réalisée sur des rats instillés avec des NP de TiO₂ de forme anatase et rutile, a montré que les NP rutile pouvaient induire des effets sur le poumon plus importants que les NP anatase (Numano et al. 2014). En effet, les NP de forme rutile induisaient un stress oxydant et une inflammation pulmonaires plus importants que celle de forme anatase, que ce soit *in vivo* ou bien *in vitro*. De plus, une prolifération des cellules épithéliales était observée, *in vitro*, en réponse aux NP de forme rutile (Numano et al. 2014).

1.1.3.6.4. Les propriétés de surface

Les NP peuvent être modifiées via l'attachement de groupes fonctionnels à leur surface ou via un recouvrement avec d'autres substances. Ces modifications peuvent avoir des effets sur la réponse biologique à ces NP. Warheit *et al* ont étudié l'impact d'un traitement de surface (alumine ou silice) sur la toxicité de NP de TiO₂ dans les poumons. Il a été montré que les NP les plus toxiques étaient celles qui contenaient la quantité la plus élevée d'alumine ou de silice à la surface de la NP de TiO₂ (Warheit et al. 2005). Au contraire, dans une étude ultérieure, la même équipe a également montré que le recouvrement de la surface de NP de TiO₂ par de l'alumine et/ou de la silice réduisait la réponse inflammatoire pulmonaire observée chez des rats exposés (Warheit et al. 2007). D'autres études plus récentes confirment l'impact du revêtement de surface sur les réponses biologiques des NP de TiO₂ (Mano et al. 2012; Saber et al. 2012). Cependant, certaines études ne montrent pas d'effets de la modification des propriétés de surface des NP. C'est le cas de l'étude de Singh *et al*. où la

méthylation de NP de TiO₂ n'a aucun impact sur la toxicité observée dans des fibroblastes humains, bien que la méthylation des particules permette une diminution de la taille des agrégats (Singh et al. 2007). Ainsi, la modification de la surface des NP semble être un facteur pouvant influencer leur toxicité, cependant, celle-ci dépend fortement du type de modification effectuée à la surface de la NP.

En conclusion, de nombreux facteurs intrinsèques aux NP peuvent influencer sur leur toxicité (taille, structure cristalline, forme, modifications de surface...). Cependant il reste difficile de statuer sur l'influence exacte de chaque paramètre sur la toxicité de ces matériaux. En effet, l'inter-dépendance des paramètres physico-chimiques des NP fait qu'il est difficile de ne modifier qu'un seul paramètre à la fois, et donc d'isoler le paramètre responsable de la leur toxicité. De plus, il est très probable qu'une variété de facteurs agit de concert pour participer aux réponses biologiques des NP, que ce soit les facteurs intrinsèques aux NP (leurs caractéristiques physico-chimiques) mais aussi des facteurs extrinsèques (concentration de NP utilisée, modèle utilisé, durée de l'exposition...).

En résumé, après une exposition pulmonaire, les NP, en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, peuvent induire des effets délétères pour l'organisme. Bien que plusieurs mécanismes biologiques aient été décrits dans la littérature comme potentiellement responsables de ces effets (notamment l'induction d'un stress oxydant et d'une réponse pro-inflammatoire), ceux-ci n'expliquent qu'en partie la toxicité des NP. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au processus autophagique en tant que nouveau mécanisme potentiellement responsable, du moins en partie, des effets toxiques des NP.

1.2. L'autophagie

L'autophagie, du grec « *autos* » (soi-même) et « *phagein* » (manger), est un terme englobant différentes voies cataboliques aboutissant à la dégradation de matériel cytoplasmique, incluant organelles et macromolécules, par les lysosomes. Ces différentes voies sont : la microautophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes et la macroautophagie, voie la plus étudiée (Figure 11).

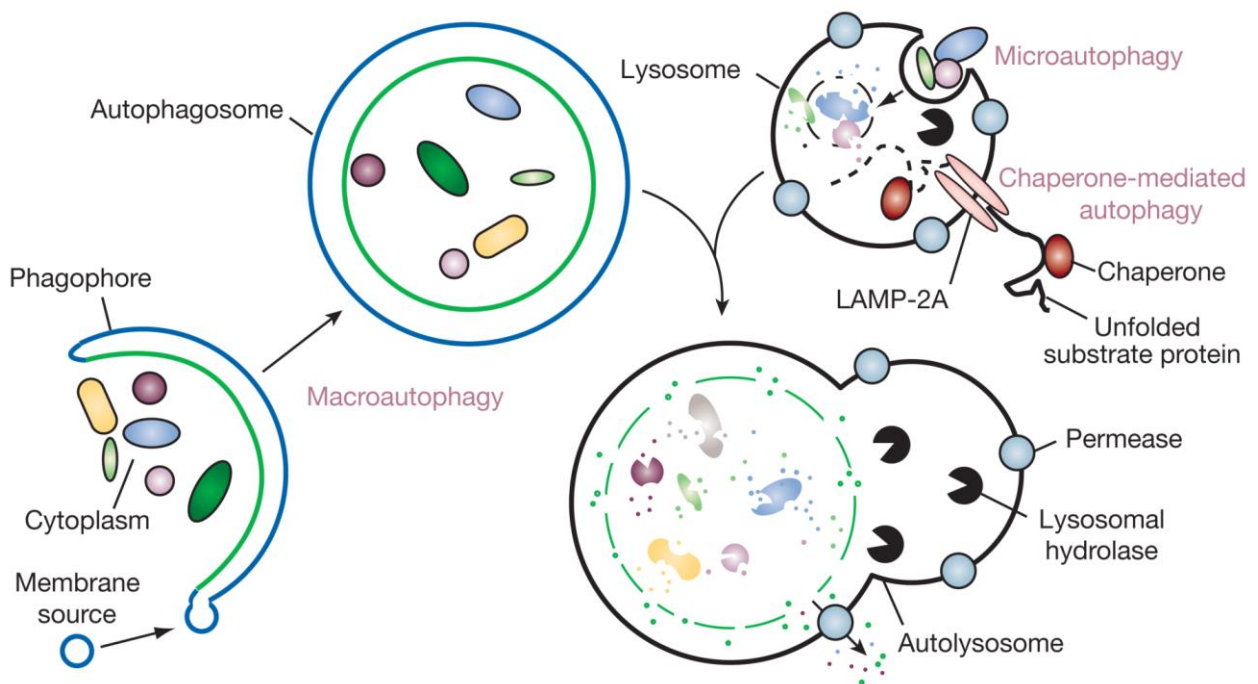


Figure 11 : Les différents types d'autophagie
(Mizushima et al. 2008)

La microautophagie, dont les mécanismes ne sont pas encore bien compris dans les cellules eucaryotes, correspond à une invagination de la membrane lysosomale conduisant à la séquestration puis à la dégradation de composants cellulaires à l'intérieur du lysosome.

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes correspond à une translocation directe et spécifique de protéines cytosoliques à travers la membrane lysosomale. Ce processus est basé sur la reconnaissance de la protéine à dégrader grâce à un motif pentapeptidique, composé de 5 acides aminés, le motif KFERQ, par des protéines

chaperonnes, notamment Hsc70 (*heat shock cognate protein of 70 kDa*), Hsp90 (*heat shock protein of 90 kDa*) et Hsp40 (*heat shock protein of 40 kDa*). Le complexe formé par la protéine à dégrader et les protéines chaperonnes migre alors vers la membrane lysosomale où la protéine LAMP-2A (*lysosomal-associated membrane protein 2A*) permettra la translocation de la protéine à l'intérieur du lysosome.

La macroautophagie, appelée plus communément autophagie (et dénommée par la suite dans ce travail comme « autophagie »), est un processus extrêmement bien conservé de la levure à l'être humain. Elle est caractérisée par la formation d'une structure à double membrane appelée autophagosome se formant autour d'une portion cytoplasmique contenant les substrats à dégrader. La taille de cette vésicule est comprise entre 0,5 µm et 1,5 µm de diamètre dans les cellules de mammifères (Mizushima et al. 2002). Cet autophagosome fusionne alors avec un lysosome pour former un autolysosome (ou autophagolysosome) dans lequel le matériel cytoplasmique séquestré sera dégradé par les enzymes lysosomales. Les petites molécules résultant de cette dégradation sont ensuite relarguées dans le cytosol via des perméases et réutilisées pour la synthèse de nouveaux constituants ou pour produire de l'énergie.

Dans les cellules, l'autophagie existe à un niveau basal afin de permettre le maintien de l'homéostasie cellulaire, en assurant notamment la dégradation et le recyclage de protéines mal conformées et d'organites endommagés. Cependant, l'autophagie peut être induite suite à de nombreux stress de différentes origines (jeûne, hypoxie, stress du réticulum endoplasmique) et permet ainsi la survie de la cellule. Par ailleurs, l'autophagie joue un rôle clé dans certaines pathologies humaines telles que les maladies neurodégénératives, les cancers, les maladies inflammatoires et pulmonaires (Levine and Kroemer 2008; Mizushima et al. 2008; Ryter et al. 2012). Ce rôle de l'autophagie dans le développement et la progression de nombreuses maladies humaines pourrait être lié à sa capacité à moduler les réponses oxydante et inflammatoire (Lee et al. 2012; Levine and Kroemer 2008).

1.2.1. Mécanismes moléculaires du processus autophagique

L'autophagie peut être divisée en plusieurs étapes : l'initiation, conduisant au déclenchement de l'autophagie avec la formation de l'autophagosome, l'étape d'élongation de l'autophagosome, puis la fusion de cet autophagosome avec un lysosome suivie par la dégradation et le recyclage du contenu autolysosomal (Figure 12). Plus de 30 gènes sont impliqués dans la régulation de ce processus.

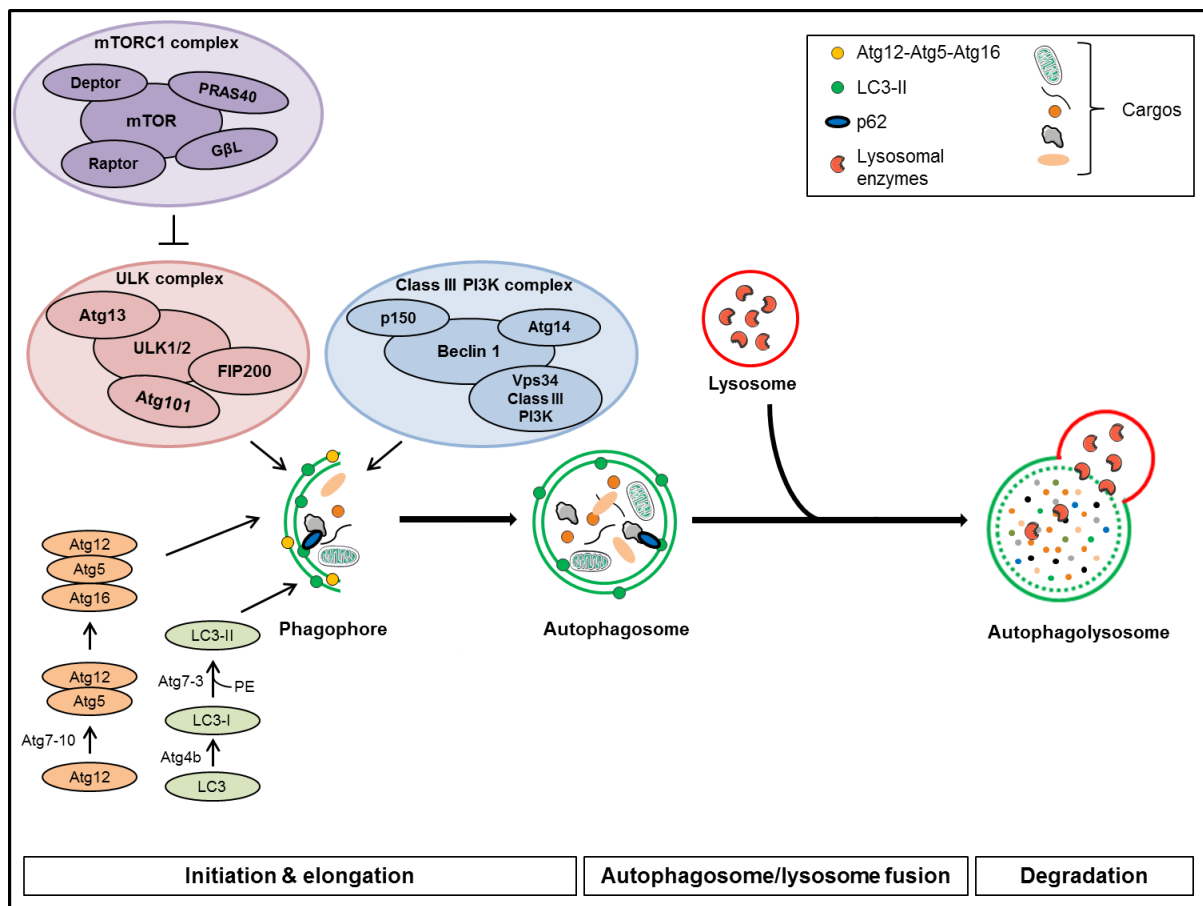


Figure 12 : Déroulement de l'autophagie
(Cohignac et al. 2014)

1.2.1.1. Initiation de l'autophagie et formation de l'autophagosome

Lors de l'initiation du processus autophagique, une membrane d'isolation, appelée phagophore, se forme autour des composants cellulaires à dégrader. L'origine exacte de cette membrane n'est pas encore clairement identifiée et semble provenir de plusieurs sources. En effet, le phagophore pourrait être produit *de novo* à partir de molécules intracellulaires préexistantes, ou provenir d'autres structures membranaires intracellulaires comme du réticulum endoplasmique, de la mitochondrie ou encore de la membrane plasmique (Geng et al. 2010; Hailey et al. 2010; Hayashi-Nishino et al. 2009; Ravikumar et al. 2010a; Yla-Anttila et al. 2009).

Le déclenchement de l'autophagie fait intervenir plusieurs complexes interconnectés. Tout d'abord, le complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), constitué de la protéine kinase mTOR, Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), GβL (*G protein β-subunit-like protein*), PRAS40 (*proline rich Akt substrate of 40 kDa*) et Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*), est impliqué dans l'inhibition de l'autophagie mais aussi dans la synthèse protéique et la régulation du cycle cellulaire. Ce complexe, inhibé par la rapamycine, est sous le contrôle de divers signaux (insuline, facteurs de croissance, charge énergétique...) et est principalement régulé via la voie PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) de classe I ou la voie AMPK. (Figure 13).

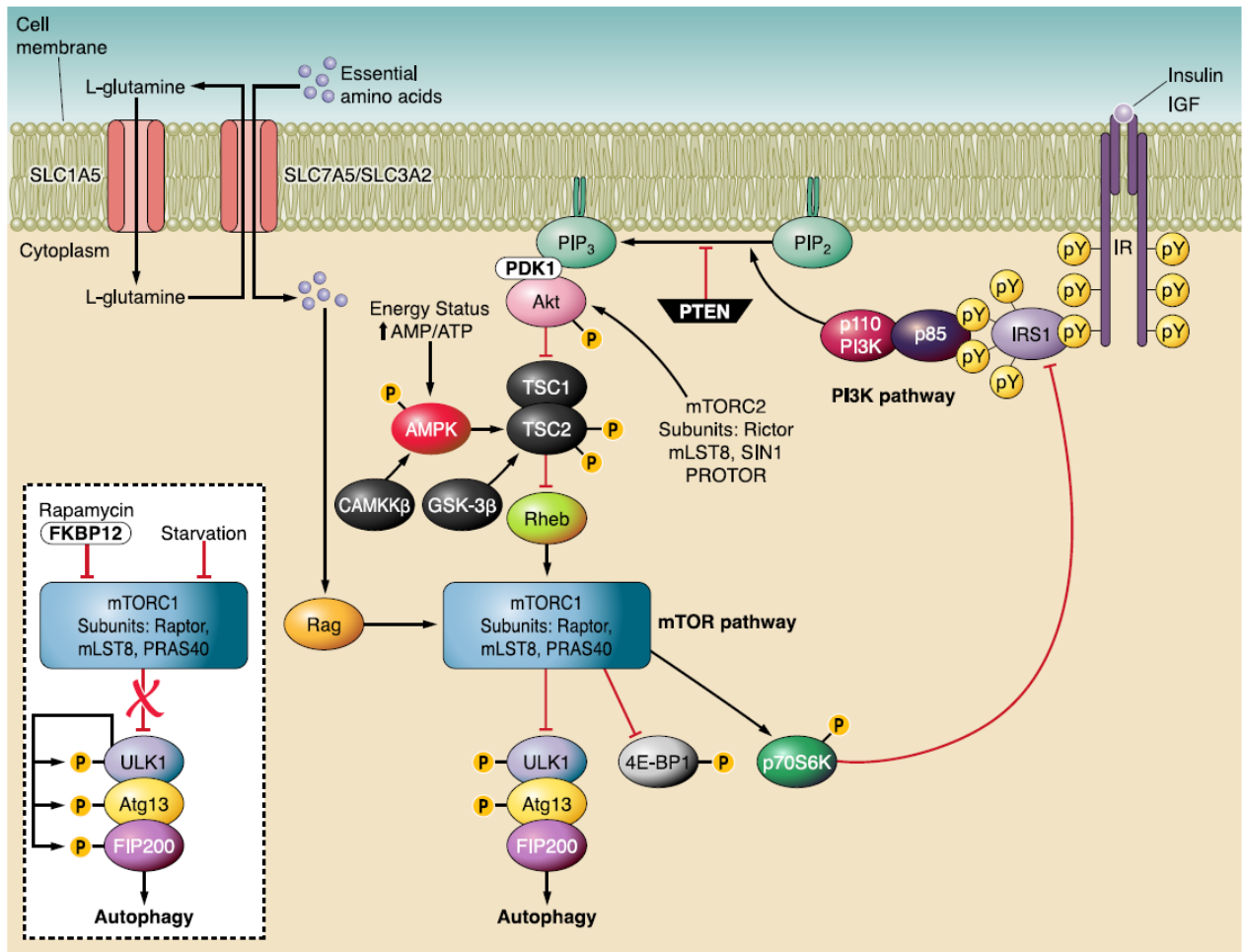


Figure 13 : Voies de signalisation mTORC1
(Ravikumar et al. 2010b)

mTORC1 interagit avec le complexe ULK (*UNC-51-like kinase*) composé des protéines ULK1/2, Atg13 (*autophagy related gene 13*), FIP200 (*focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*) et d'une protéine régulatrice Atg101. En conditions riches en nutriments, le complexe mTORC1 phosphoryle les protéines ULK1/2 et Atg13, inhibant ainsi le complexe ULK et donc l'autophagie. Au contraire, quand mTORC1 est inhibé (en cas de jeûne ou par traitement par la rapamycine), les protéines ULK1/2 et Atg13 sont sous forme déphosphorylée. Les protéines kinases ULK peuvent alors s'autophosphoryler et phosphoryler les protéines Atg13 et FIP200 induisant ainsi la formation de l'autophagosome.

La formation de membranes autophagosomales nécessite également l'intervention d'un complexe composé d'une protéine PI3K de classe III, Vps34 (*vacuolar protein sorting 34*), et des protéines beclin 1 et p150. L'interaction de Vps34 et de la beclin 1 par l'intermédiaire de p150 est indispensable à l'activation de Vps34 et ainsi à la production de phosphatidylinositol-3-phosphate, molécule lipidique importante pour la formation des

autophagosomes via le recrutement des protéines nécessaires à l'élongation du phagophore (Burman and Ktistakis 2010; Mizushima et al. 2011). La liaison de beclin 1 avec ses protéines partenaires peut aussi moduler l'activité du complexe PI3K. Ainsi, la liaison de beclin 1 avec la protéine Atg14, Ambra, UVRAG, Rab5 ou Bif1 aura pour effet d'activer ce complexe et donc l'autophagie (Fimia et al. 2007; Liang et al. 2006; Takahashi et al. 2007). Au contraire, la liaison de beclin 1 avec la protéine Bcl-2, Rubicon, IP3R, ou encore NAF-1 inhibera son activité (Chang et al. 2010; Pattingre et al. 2005; Vicencio et al. 2009). L'activité du complexe PI3K peut également être régulée par le complexe ULK. En effet, une étude récente a permis de mettre en évidence un lien entre le complexe ULK et la beclin 1 : en condition de jeûne, ULK phosphorylerait directement la beclin 1, activant ainsi le complexe PI3K et conduisant alors à l'activation de l'autophagie (Russell et al. 2013).

1.2.1.2. Elongation de l'autophagosome

Cette étape correspond à l'extension de la membrane d'isolement (allongement du phagophore) conduisant à la formation d'une structure à double membrane, appelée autophagosome, contenant le matériel à dégrader. Deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* interviennent dans la formation de cet autophagosome.

Dans le premier système de conjugaison, Atg12 se lie de façon covalente à Atg5 via l'action successive d'Atg7 (enzyme *E1-like*) et d'Atg10 (enzyme *E2-like*). Le complexe Atg12-Atg5 se lie ensuite à Atg16L et s'associe en tétramère pour former un complexe multimérique de 800 kDa. Ce complexe est essentiel pour l'élongation des membranes pré-autophagosomales mais se dissocie des autophagosomes matures (Kuma et al. 2002; Mizushima et al. 2003).

Le deuxième système de conjugaison conduit à la formation d'un conjugué protéine – phospholipide constitué de LC3 (*microtubule associated-protein 1 light chain*) et de la PE (*phosphatidylethanolamine*). La forme précurseur de la protéine LC3 est tout d'abord activée en une forme cytosolique soluble LC3-I par clivage par Atg4b, une protéase à cystéine. La protéine LC3-I est ensuite conjuguée à la PE via l'action successive d'Atg7 (enzyme *E1-like*) et d'Atg3 (enzyme *E2-like*) pour former la forme LC3-II associée aux membranes interne et externe des autophagosomes en formation (Tanida et al. 2004a; Tanida et al. 2004b).

Contrairement au conjugué Atg12-Atg5-Atg16L, la protéine LC3-II restera associée à la membrane jusqu'à la fermeture de l'autophagosome, où la forme présente sur la membrane externe de l'autophagosome sera clivée par Atg4 et recyclée (Tanida et al. 2004b). La protéine LC3-II présente au niveau de la membrane interne de l'autophagosome sera dégradée par les enzymes lysosomales après fusion avec le lysosome. L'association spécifique de LC3-II à l'autophagosome fait de cette protéine un excellent marqueur de l'autophagie.

Il a été montré que ces deux systèmes de conjugaison indispensables à la formation et l'élongation de l'autophagosome étaient interconnectés. En effet, le complexe Atg12-Atg5-Atg16L joue la fonction d'enzyme *E3-like* afin de favoriser l'interaction de LC3-I à la PE (Hanada et al. 2007). Par ailleurs, ce complexe pourrait spécifier le site de lipidation de LC3 pour la conjugaison à la PE (Fujita et al. 2008). Il a également été montré qu'Atg10 pouvait lui aussi interagir avec LC3 afin de favoriser sa lipidation (Nemoto et al. 2003).

1.2.1.3. Maturation des autophagosomes et fusion avec les lysosomes

Après leur formation dans le cytoplasme, les autophagosomes vont fusionner avec les lysosomes pour former les autolysosomes. Dans les cellules de mammifères, les autophagosomes sont formés de façon aléatoire dans le cytoplasme cellulaire. Ces structures doivent se trouver à proximité des lysosomes, avec lesquels ils vont fusionner, se trouvant majoritairement dans la zone périnucléaire, autour du centre organisateur des microtubules (MTOC, *microtubule organising center*) (Jahreiss et al. 2008). Le transport des autophagosomes vers les lysosomes nécessite ainsi la mobilisation des microtubules et l'intervention des protéines motrices dynéines (Kimura et al. 2008). L'inhibition de ce transport, via la dépolymérisation des microtubules ou l'inhibition des protéines motrices, peut donc entraîner un blocage de l'autophagie (Ravikumar et al. 2005; Webb et al. 2004).

Avant cette étape, les autophagosomes peuvent également fusionner avec des endosomes précoces, matures ou encore des corps multivésiculaires pour former des amphisomes qui fusionneront ensuite avec les lysosomes, établissant ainsi un lien entre la voie autophagique et les voies endosomales (Berg et al. 1998). La formation de l'amphisome nécessite l'intervention de plusieurs protéines, notamment Rab11, le complexe HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*) et les protéines des différents complexes ESCRT

(*endosomal sorting complex required for transport*) (Lee et al. 2007; Rusten and Stenmark 2009). La fusion des autophagosomes/amphisomes avec les lysosomes requiert plusieurs protéines, notamment des protéines membranaires de la famille SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*), des petites GTPases de la famille Rab (en particulier Rab7), les protéines LAMP1 et LAMP2 (*lysosome-associated membrane protein*) et des protéines de classe C Vps (Gutierrez et al. 2005; Jager et al. 2004; Liang et al. 2008; Renna et al. 2011; Tanaka et al. 2000). Les protéines partenaires de beclin 1, comme UVRAG et Rubicon, peuvent également être impliquées dans le processus de fusion autophagosomes/lysosomes (Liang et al. 2008). Il a en effet été montré que la protéine UVRAG, pouvait, indépendamment de son interaction avec la beclin 1, recruter les protéines Vps de classe C et ainsi activer Rab7, étape indispensable à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Liang et al. 2008; Matsunaga et al. 2009; Zhong et al. 2009). Par ailleurs, l'acidification du lysosome semble être essentielle à sa fusion avec l'autophagosome. En effet, une inhibition des pompes de type H^+ - ATPase, permettant l'acidification du lysosome, par un agent chimique comme la bafilomycine A1, inhibe la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Yamamoto et al. 1998).

1.2.1.4. Dégradation et recyclage du matériel cytoplasmique

Après l'étape de fusion, la membrane interne de l'autophagosome et le matériel cytoplasmique séquestré dans celui-ci sont dégradés par les enzymes hydrolases acides contenues dans le lysosome, notamment les protéinases A et B et les cathepsines B, D et L (Tanida et al. 2005). Les acides aminés résultant de cette dégradation sont transportés dans le cytoplasme pour y être recyclés.

1.2.2. Evaluation de l'activité autophagique

L'autophagie est un processus dynamique, il est donc nécessaire de mesurer le flux autophagique afin de pouvoir statuer sur l'état de l'autophagie dans les cellules. Ainsi, l'évaluation du nombre d'autophagosomes seule (par observation au microscope électronique à transmission ou par quantification du niveau d'expression de LC3-II) n'est pas suffisante

pour conclure quant à l'efficacité de l'autophagie. LC3-II est associée à la membrane de l'autophagosome, ce qui en fait un bon marqueur des autophagosomes mais pas du flux autophagique. En effet, la quantification de l'expression de la protéine LC3-II à un moment donné rend compte de la balance entre sa formation et sa dégradation. Ainsi, une étude basée uniquement sur le niveau d'expression de cette protéine ne permet pas de discriminer deux scénarios opposés : une activation de l'autophagie (formation de LC3-II) *versus* un blocage des étapes finales de l'autophagie (absence de dégradation de LC3-II), suggérant une autophagie défectueuse (Klionsky et al. 2012; Mizushima 2004). Il est donc essentiel, afin de pouvoir différencier ces deux différents scénarios et ainsi de conclure sur l'état fonctionnel de l'autophagie, de combiner l'évaluation du nombre d'autophagosomes avec des expériences de mesure du flux autophagique. Le flux autophagique peut être mesuré en utilisant des inhibiteurs de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Des agents lysomotropiques comme la bafilomycine A1 ou la chloroquine, inhibant l'acidification des lysosomes et/ou la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, bloquent la dégradation de la protéine LC3-II, ce qui conduit ainsi à son accumulation. En conséquence, la différence des niveaux d'expression de LC3-II entre l'échantillon traité en présence et en absence de l'inhibiteur reflète le flux autophagique. De la même façon, des inhibiteurs des protéases lysosomales comme E64 ou la pepstatine A peuvent être utilisés pour mesurer le flux autophagique (Mizushima et al. 2010). Ce flux peut également être évalué en mesurant le niveau d'expression de substrats normalement dégradés par le processus autophagique comme la protéine p62/SQSTM1 (sequestosome 1). p62 est une protéine se liant directement à LC3-II et fonctionnant comme un récepteur pour la dégradation des protéines ubiquitinylées ciblées par l'autophagie. Une augmentation d'expression de cette protéine p62 est donc un indicateur fiable d'une dysfonction de l'autophagie tandis qu'une diminution de son expression rend compte d'un flux autophagique efficace. Une revue détaillée de la littérature sur les méthodes de suivi de l'autophagie a été publiée par Klionsky *et al.* (Klionsky et al. 2012).

1.2.3. Rôle de l'autophagie et implication dans des pathologies

L'autophagie est essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire en permettant la dégradation de protéines pour les besoins énergétiques de la cellule mais aussi l'élimination et le recyclage des composés cytoplasmiques endommagés. En conséquence, ce processus est

indispensable à la survie cellulaire. Ainsi, une dérégulation de ce processus, que ce soit une inhibition ou une suractivation, peut aboutir à des conditions délétères pour la cellule et conduire au développement de pathologies. De nombreuses études ont en effet mis en évidence une association entre certaines pathologies et des dysfonctionnements du processus autophagique (Choi et al. 2013; Jiang and Mizushima 2014). Cela a notamment été décrit dans le cas de certaines maladies pulmonaires comme dans d'autres contextes.

1.2.3.1. Autophagie et maladies pulmonaires non tumorales

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une maladie complexe caractérisée par une obstruction lente et progressive des voies aériennes pulmonaires, associée à un emphysème (destruction des parois alvéolaires), et dont la cause principale reste l'exposition aux particules inhalées (notamment à la fumée de cigarette). Une induction de l'autophagie a été décrite dans des biopsies de poumons de patients atteints de BPCO, via l'accumulation d'autophagosomes au microscope électronique et l'augmentation d'expression de marqueurs autophagiques comme LC3-II, beclin 1 et des protéines Atg4, Atg5 et Atg7 (Chen et al. 2008). Une induction de la formation d'autophagosomes a également été observée dans différents types de cellules pulmonaires humaines (cellules épithéliales et fibroblastes) exposées à de l'extrait de fumée de cigarette (Chen et al. 2008; Hwang et al. 2010; Kim et al. 2008). L'expression des marqueurs de l'autophagie était élevée dans les étapes précoces de la BPCO, alors que l'activation de la caspase, molécule pro-apoptotique, était détectable dans les étapes tardives de la maladie (Chen et al. 2008). Ces résultats suggèrent que la stimulation du processus autophagique pourrait avoir des effets délétères, principalement en induisant l'apoptose promouvant ainsi la destruction des parois alvéolaires en réponse à la fumée de cigarette. La déplétion génétique de LC3B ou d'Egr-1 (*early growth response 1*), une molécule impliquée dans la transcription de LC3B, est associée à une résistance à l'emphysème chez la souris exposée à la fumée de cigarette (Chen et al. 2008; Chen et al. 2010). Une étude plus récente a montré que l'autophagie était impliquée dans la pathogenèse de la bronchite associée à la BPCO. En effet, des souris déficientes pour l'autophagie, ont montré une résistance à la perturbation de la clairance mucociliaire induite par une exposition à la fumée de cigarette *in vivo* (Lam et al. 2013).

Par ailleurs, l'étude de Monick *et al.*, a révélé une accumulation d'autophagosomes (mis en évidence par microscopie électronique et augmentation du niveau d'expression de LC3-II) dans des macrophages alvéolaires de patients fumeurs mais aussi dans des macrophages alvéolaires de patients non-fumeurs exposés à de l'extrait de fumée de cigarette *in vitro* (Monick *et al.* 2010). De façon intéressante, en étudiant le flux autophagique (utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie et quantification de l'expression de p62), les auteurs ont démontré que l'autophagie n'était pas fonctionnelle dans ces cellules. Les auteurs suggèrent que la perturbation du processus autophagique observée dans ces cellules conduirait à des défauts fonctionnels des macrophages alvéolaires, en particulier une incapacité à éliminer les bactéries de la surface alvéolaire (avec une diminution de la dégradation lysosomale des bactéries dans ces cellules), ce qui pourrait expliquer les infections récurrentes, comme la pneumonie, observées chez les fumeurs. De façon cohérente, une étude parue récemment suggère un rôle protecteur de l'autophagie dans le développement de la BPCO. En effet, une augmentation des niveaux des protéines ubiquitinées et de la protéine p62, suggérant une autophagie non fonctionnelle, a été observée dans des cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à la fumée de cigarette, mais aussi *in vivo*, dans des poumons de patients BPCO. L'ensemble de ces études suggèrent que l'autophagie pourrait jouer un rôle clé dans la réponse à la fumée de cigarette et donc dans le développement et la progression de la BPCO.

Il est intéressant de noter que, de la même façon que ce qui a été observé chez les patients atteints de BPCO, une dérégulation de l'autophagie a été observée dans les tissus pulmonaires de patients souffrant d'emphysème causé par une anomalie génétique (déficit en α 1-antitrypsine) et dont l'étiologie n'est pas nécessairement liée à une exposition aux particules inhalées (Perlmutter 2006). Ces résultats suggèrent donc que, en plus de l'exposition à la fumée de cigarette, des facteurs intrinsèques, tels qu'une augmentation de la protéolyse matricielle ou une altération de certaines voies de signalisation, pourraient contribuer à la dérégulation du processus autophagique observée chez les patients atteints de BPCO.

L'autophagie semble également être impliquée dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). En effet, une augmentation de l'expression de marqueurs de l'autophagie, notamment LC3-II et un nombre élevé d'autophagosomes, ont été

observés dans les tissus pulmonaires de souris mises en conditions d'hypoxie (modèle murin d'HTAP) comparés aux souris contrôles. De plus, la délétion génétique de LC3B, mais aussi d'Egr1, induit une sensibilité accrue à l'HTAP induite par hypoxie chez ces souris (Lee et al. 2011b). Ces résultats ont été confirmés chez l'homme, où une plus forte expression de LC3-II a été observée dans des biopsies de poumons de patients atteints d'HTAP comparés à des biopsies de poumons de sujets contrôles (Lee et al. 2011b). Bien que les conclusions de ces études soient uniquement basées sur le nombre d'autophagosomes et ne statuent pas sur l'efficacité du flux autophagique, ces résultats suggèrent qu'une atteinte de l'autophagie pourrait jouer un rôle dans les maladies vasculaires pulmonaires.

La mucoviscidose est une maladie génétique liée à une mutation du gène codant pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) et caractérisée par une accumulation d'un mucus anormalement visqueux au niveau des épithéliums glandulaires, notamment dans les voies respiratoires. Une étude parue en 2010 a montré que la mutation de la protéine CFTR dans des cellules épithéliales humaines provenant de patients atteints de mucoviscidose était associée à une dysfonction de l'autophagie, avec une diminution de l'expression de LC3-II et une augmentation de l'expression de la protéine p62. Ces cellules présentaient également une accumulation de protéines polyubiquitinylées et une diminution de la prise en charge des aggrésomes (Luciani et al. 2010). De plus, il a également été montré que la mutation CFTR conduisait à une inhibition de l'autophagie via une perte de fonction de la beclin 1. La restauration du processus autophagique par surexpression de cette protéine permet de restaurer le transport à la membrane du mutant CFTR, de réduire son accumulation dans les aggrésomes et d'améliorer le phénotype pulmonaire de la mucoviscidose (Luciani et al. 2010). Par ailleurs, le traitement par de la rapamycine, une molécule inductrice de l'autophagie, peut limiter l'infection par la bactérie *Burkholderia cenocepacia* chez les patients mucoviscidosiques, potentiellement mortelle pour ces patients, et aussi diminuer l'inflammation pulmonaire associée chez les souris atteintes de cette pathologie (Abdulrahman et al. 2011). En résumé, ces résultats suggèrent qu'une autophagie défectueuse pourrait être impliquée dans la mucoviscidose et dans l'inflammation pulmonaire associée.

De la même façon, des dérégulations du processus autophagique ont été mises en évidence dans le cas d'autres maladies pulmonaires comme la tuberculose ou encore l'insuffisance respiratoire aiguë et sont discutées dans la littérature (Haspel and Choi 2011; Mizumura et al. 2012; Ryter and Choi 2015).

1.2.3.2. Autophagie et cancers

Le rôle de l'autophagie dans les pathologies cancéreuses est complexe. En effet, l'autophagie, de par sa fonction d'élimination des protéines et organites endommagés, potentiellement cancérogènes, peut agir en tant que suppresseur de tumeur. De plus, l'autophagie peut favoriser la survie des cellules en conditions de stress, notamment en fournissant de l'énergie aux cellules cancéreuses généralement en état de jeûne et en hypoxie (lorsque la tumeur est peu ou pas encore vascularisée) mais aussi en favorisant la survie des tumeurs contre des substances chimiques utilisées en thérapie (Kondo et al. 2005; Ogier-Denis and Codogno 2003).

Une partie de l'explication de cette complexité réside dans le fait que la tumorigenèse et l'autophagie sont deux processus dont les voies de régulation sont très intriquées. En effet, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN, TSC1/2, DRAM et DAPK régulent de façon positive l'autophagie, tandis que certains oncogènes, entre autres, PI3K de classe 1, AKT/PKB ou Bcl-2 inhibent l'autophagie (Choi et al. 2013). Une des premières études ayant permis de mettre en évidence le rôle de l'autophagie dans la suppression tumorale est celle de Liang *et al.* Ces travaux ont montré que dans un grand nombre de cancers chez l'homme, des anomalies touchant un allèle du gène codant pour la beclin 1 (délétion mono-allélique) étaient retrouvées (dans 75% des cancers ovariens, 50% des cancers du sein et dans 40% des cancers de la prostate) (Liang et al. 1999; Qu et al. 2003). De plus, des souris haploinsuffisantes pour la beclin 1 développent des tumeurs spontanées (Yue et al. 2003), tandis que la surexpression de la beclin 1 conduit à une réduction du développement tumoral (Liang et al. 1999). Par ailleurs, il a également été observé que d'autres gènes impliqués dans la voie de l'autophagie, comme par exemple, UVRAG, Atg5 ou Bif1, étaient mutés dans des cancers chez l'Homme, induisant vraisemblablement des anomalies de l'autophagie dans les cellules mutées (Coppola et al. 2008; Liang et al. 2006; Liu et al. 2013).

De nombreuses études suggèrent également un rôle de l'autophagie dans la progression tumorale. L'autophagie, en fournissant de l'énergie aux cellules, permet aux cellules cancéreuses de se maintenir en vie dans des conditions de carence en nutriments. En effet, le gène codant pour la beclin 1, n'a jamais été retrouvé muté sur ses deux allèles dans des cellules malignes, contrairement à de nombreux autres gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui suggère une certaine dépendance des tumeurs vis-à-vis de l'autophagie (Qu et al. 2003; Yue et al. 2003). De plus, malgré une réduction de l'activité autophagique dans certaines tumeurs malignes, les autophagosomes restent présents, en particulier dans les régions de la tumeur les plus stressées métaboliquement (Sato et al. 2007). Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie, via la délétion de gènes comme Atg5 ou FIP200, réduit sensiblement la progression des tumeurs pré-établies chez la souris (Guo et al. 2013; Rao et al. 2014; Wei et al. 2011). De plus, l'inhibition pharmacologique de l'autophagie dans des tumeurs colorectales provoque la mort cellulaire, soulignant le rôle essentiel de l'autophagie dans la survie cancéreuse (Sato et al. 2007).

L'implication de l'autophagie dans le développement et la progression des cancers reste complexe et pas encore totalement comprise. Cependant, il semble que l'autophagie pourrait donc à la fois, inhiber l'initiation d'un processus cancéreux mais aussi favoriser le développement d'un cancer déjà établi. Pour conclure, l'autophagie pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des cancers mais les stratégies pour y arriver restent complexes étant donné le double rôle de l'autophagie dans ces pathologies (Choi 2012; White 2015).

1.2.3.3. Autophagie, inflammation et stress oxydant

Le rôle de l'autophagie dans les différentes pathologies présentées précédemment pourrait être lié à sa capacité à moduler les réponses inflammatoires et oxydantes associées à ces pathologies.

La machinerie autophagique joue un rôle majeur dans le contrôle de l'inflammation. En effet, il a été mis en évidence que l'autophagie pouvait réguler de façon négative l'inflammation, via notamment l'inhibition de l'activation des inflammasomes, complexes multiprotéiques impliqués dans la maturation et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires

IL-1 β et IL-8 (Schroder and Tschopp 2010). En effet, l'autophagie basale, en dégradant les mitochondries endommagées, à l'origine de la production de ROS, va empêcher l'activation des inflammasomes par les ROS, et ainsi réduire la réponse inflammatoire (Nakahira et al. 2011; Zhou et al. 2011). Un blocage de l'autophagie conduit alors à une activation de l'inflammasome et donc à la production de cytokines inflammatoires. Par ailleurs, en plus de contrôler la production de cytokines via la régulation de l'activation des inflammasomes, l'autophagie peut également cibler directement la forme précurseur de l'IL-1 β pour une dégradation lysosomale (Harris et al. 2011). Shi *et al* ont montré que l'activation des inflammasomes dans des macrophages conduisait à la formation d'autophagosomes et que le blocage de l'autophagie exacerbait l'activation des inflammasomes (Shi et al. 2012). Leurs résultats suggèrent l'existence d'une voie de rétrocontrôle négatif où l'activation de l'inflammasome conduirait à l'activation de l'autophagie qui, en retour, contrôlerait négativement l'inflammation en dégradant les inflammasomes actifs. De plus, l'autophagie permet de limiter la réponse inflammatoire en dégradant également les corps apoptotiques, susceptibles de relarguer des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs, *damage-associated molecular pattern*), pouvant induire la libération de cytokines pro-inflammatoires (Levine et al. 2011). Par ailleurs, la production d'IL-1 β et d'IL-18 induite par des endotoxines est augmentée chez des souris déficientes pour le gène Atg16L1, indispensable au processus autophagique (Saitoh et al. 2008).

L'autophagie est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de gènes intervenant dans la réponse pro-inflammatoire. En effet, lorsque l'autophagie est défectueuse, la protéine p62, substrat de l'autophagie, s'accumule et conduit à l'oligomérisation de TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*) et ainsi à l'activation de NF- κ B, facteur de transcription impliqué dans la réponse inflammatoire (Ling et al. 2012; Mathew et al. 2009; Moscat and Diaz-Meco 2012). Une des preuves du rôle de l'autophagie dans la réponse inflammatoire vient du fait que de nombreux gènes intervenant dans le processus autophagique sont associés avec des pathologies à composante inflammatoire. En effet, plusieurs travaux ont montré que chez des patients atteints de la maladie de Crohn, une maladie inflammatoire chronique du système digestif, des polymorphismes étaient retrouvés dans la séquence de gènes impliqués dans l'autophagie, comme par exemple dans celle du gène Atg16L1, Irgm1 (*immune related GTPase M-1*), ou encore ULK1 (Consortium 2007; Henckaerts et al. 2011).

Comme tous les stress, le stress oxydant peut induire l'autophagie, et cette dernière peut également moduler la réponse à ce stress oxydant. En effet, il a été montré que l'induction de l'autophagie par le jeûne était en fait régulée via la production de ROS, notamment celle d' O_2^- et d' H_2O_2 (Chen et al. 2009a; Scherz-Shouval et al. 2007). Dans une de ces études, il a en fait été montré que l' H_2O_2 pouvait inhiber la protéine Atg4 au niveau du site de formation de l'autophagosome, promouvant ainsi la lipidation de LC3-I en LC3-II, et ainsi permettant l'activation de l'autophagie (Scherz-Shouval et al. 2007). De plus, il a été montré que l'autophagie pouvait être induite dans des cellules provenant de tumeurs gliales et traitées au peroxyde d'hydrogène, via la voie Akt/mTOR et le complexe PI3K/beclin 1 (Zhang et al. 2009a). L'idée que les ROS jouent un rôle dans l'induction du processus autophagique vient aussi d'études ayant montré que l'induction de l'autophagie par le jeûne était dépendante de la production de l'anion superoxyde O_2^- , et que la surexpression d'enzymes anti-oxydantes, comme la superoxyde dismutase et/ou la catalase, protégeait les cellules HeLa contre l'autophagie induite par ce jeûne (Chen et al. 2009a).

L'autophagie peut également moduler la réponse oxydante en inhibant notamment la production de ROS. En effet, il a été montré qu'un blocage de l'autophagie conduisait à une augmentation du stress oxydant (Farombi 2006; Hara et al. 2006; Park et al. 2008; Park et al. 2004; Yamasaki et al. 2007). L'autophagie joue un rôle majeur dans la régulation de la réponse oxydante en dégradant les mitochondries endommagées, qui sont la principale source de production de ROS. En effet, une autophagie sélective ciblant les mitochondries et appelée la mitophagie, permet à la cellule de se protéger contre le stress oxydatif en éliminant les mitochondries défectueuses (Lemasters 2005). Par exemple, une augmentation de la production de ROS a été observée dans des cellules déficientes pour la mitophagie (Kurihara et al. 2012). De plus, plusieurs études suggèrent un rôle essentiel de l'autophagie dans la dégradation des protéines oxydées, notamment via l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (Kaushik and Cuervo 2006; Kiffin et al. 2004). De façon cohérente avec ces résultats, la protéine p62, de par son rôle de dégradation des agrégats protéiques par l'autophagie, pourrait être également impliquée dans la dégradation de ces protéines oxydées et ainsi participer à la régulation de la réponse au stress oxydant par l'autophagie. Par ailleurs, en réponse à un stress oxydant, le facteur de transcription nucléaire Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived 2 like 2*), impliqué dans la transcription de gènes antioxydants, comme l'hème oxygenase, peut induire l'expression de p62, qui à son tour, peut activer Nrf2, formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive permettant de réduire la réponse oxydative (Jain et al. 2010; Komatsu et al. 2010).

En conclusion, l'autophagie est un processus physiologique permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire. Des altérations du processus autophagique, comme une activation anormale ou bien une activité défectueuse, sont associées avec de nombreuses pathologies, et sont probablement liées à l'interdépendance entre l'autophagie, l'inflammation et/ou le stress oxydant. Etant donné que ces deux derniers mécanismes sont les deux mécanismes principalement décrits comme sous-jacents aux effets des nanomatériaux, et que les principales voies d'entrée des NP dans la cellule convergent vers le lysosome, acteur majeur du processus autophagique, une meilleure compréhension du rôle potentiel de l'autophagie dans la toxicité des nanoparticules (Figure 14) semble nécessaire.

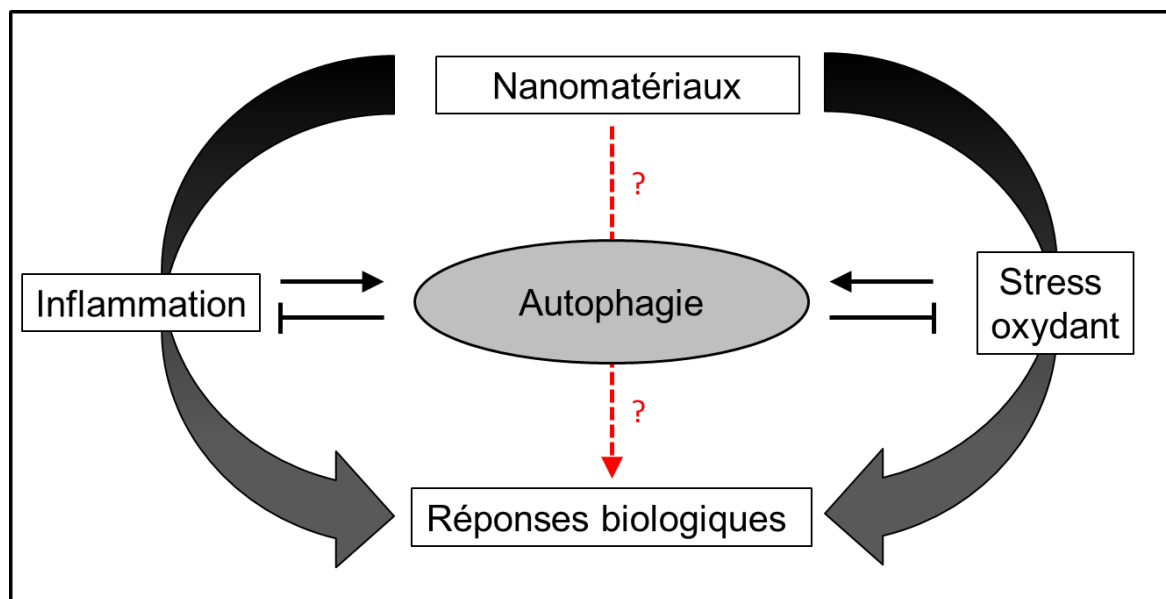


Figure 14 : Relation hypothétique entre l'autophagie et les réponses biologiques aux nanomatériaux
(Cohignac et al. 2014)

1.3. Autophagie et nanoparticules

L'implication de l'autophagie dans la toxicité des NP n'a été proposée que très récemment, la grande majorité des études sur le sujet n'ayant été publiées qu'après 2010. Les paragraphes suivants ont pour but de résumer les différentes études, existantes dans la littérature, et décrivant les effets des NP sur l'autophagie. Au regard de la littérature sur le sujet, il semble que ces différents travaux puissent être divisés en deux parties selon leurs protocoles expérimentaux : ceux se limitant à l'analyse des autophagosomes et ceux allant plus loin et analysant également le flux autophagique. Or, comme décrit précédemment, il est impératif de combiner ces deux types d'analyse pour pouvoir conclure sur l'implication de l'autophagie dans la réponse à tout type d'exposition.

Nous avons donc choisi de présenter la littérature existante à ce jour en deux parties : les études s'intéressant seulement à la formation des autophagosomes (Tableau 2) et celles plus complètes et analysant le flux autophagique (Tableau 3). Ces listes, les plus exhaustives possibles, nous permettent d'avoir une idée un peu plus précise des effets des NP sur le processus autophagique. Par souci de clarté, les NP ont été regroupées par famille chimique dans chaque tableau.

1.3.1. NP et accumulation d'autophagosomes

La majorité des études concernant les effets des nanomatériaux sur l'autophagie sont des études utilisant principalement des lignées cellulaires, une faible proportion utilisant des cellules primaires. Seulement quelques travaux résultent d'expérimentations sur des modèles animaux (Chen et al. 2013a; Liu et al. 2011; Yu et al. 2013a; Yu et al. 2015b). Cela est probablement dû à la difficulté de mettre en œuvre des méthodes pertinentes pour mesurer l'autophagie *in vivo*. La grande majorité des études réalisées montrent une augmentation du nombre d'autophagosomes en réponse aux nanomatériaux, observée par quantification de l'expression de marqueurs des autophagosomes et de leur formation (LC3, les protéines Atg, beclin 1) ou par observations au microscope électronique à transmission (MET) (Tableau 2 et Tableau 3). Ainsi, sur la base de ces données, et malgré l'absence d'évaluation du flux autophagique, une induction de l'autophagie a été rapportée pour plusieurs types de NP

(Tableau 2), que ce soit des NP métalliques (en particulier les oxydes de fer, l'or et le TiO_2) ou des NP carbonées (fullerènes et CNT), et ce dans des modèles cellulaires variés (cellules pulmonaires, cellules de l'immunité, cellules endothéliales...). Les NP pourraient induire l'autophagie via l'induction d'un stress oxydant. En effet, l'étude de Zhang et al a montré que l'induction de l'autophagie par des fullerènes dans des cellules cervicales était supprimée par des antioxydants comme la NAC, le glutathion réduit ou encore l'acide L-ascorbique (Zhang et al. 2009b). Des dysfonctions mitochondriales, cause probable d'un stress oxydant, ont également été rapportées comme pouvant conduire à l'induction de l'autophagie par les NP (Johnson-Lyles et al. 2010; Khan et al. 2012). Certaines études montrent également une implication de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans l'induction de l'autophagie par les NP (Duan et al. 2014b; Li et al. 2009; Liu et al. 2011). Les données de l'étude de Khan *et al* montrent ainsi une diminution de la phosphorylation d'Akt et de mTOR en réponse aux NP d'oxydes de fer dans des cellules épithéliales pulmonaires. Cela suggère donc que l'accumulation d'autophagosomes observée en réponse à ces NP serait, du moins en partie, médiée par cette voie (Khan et al. 2012). Une étude relativement récente a également suggéré un possible rôle des TLR dans l'accumulation des autophagosomes observée en réponse à des oxydes de graphène dans des macrophages RAW264.7 (Chen et al. 2014a).

NP MÉTALLIQUES	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
	Oxydes de fer	51,34 ± 14,71	Cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses humaines (A549), fibroblastes pulmonaires humains (IMR-90)	LC3, Atg5, Atg12, voie de signalisation AMPK et Akt-mTOR	Western-Blot, MDC, utilisation d'inhibiteurs (3-MA) et d'activateur (compound C) de l'autophagie	↗ formation d'autophagosomes, induite via la voie AMPK-mTOR-Akt, ↗ de la mort cellulaire autophagique. Résultats confirmés seulement dans la lignée cellulaire cancéreuse	(Khan et al. 2012)
	Fe-Au NP (cœur Fe recouvert d'Au)	10	Keratinocytes primaires oraux humains (hNOK), cellules cancéreuses orales humaines (OECM1)	LC3	MET, Western-blot, immunofluorescence, utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie (3-MA, CQ)	↗ formation d'autophagosomes, probablement induite par des dysfonctions mitochondriales, ↗ de la mort cellulaire autophagique	(Wu et al. 2011)
	Au NP	20	Fibroblastes pulmonaires humains (MRC-5)	LC3, Atg5, Atg7, Atg12, beclin 1	MET, Western-Blot	↗ formation d'autophagosomes	(Li et al. 2010a)
	Au NP modifiées avec le peptide PEG/SV40	31,57 ± 0,93	Cellules cervicales humaines (HeLa, SiHa)	LC3	MET, Western-Blot, transfection transitoire GFP-LC3, ARNsi beclin 1	↗ formation d'autophagosomes dans les cellules HeLa uniquement, ↗ mort cellulaire autophagique	(Tsai et al. 2012)
	Nanofibres d'Ag	Diamètre moyen de 82,4 et longueur de 3000 à 6250	Monocytes humains (THP-1), monocytes murins de moelle osseuse (iBMM)	LC3	MET, Western-blot, transfection stable GFP-LC3	↗ formation d'autophagosomes	(Verma et al. 2012)

	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
	Mn NP	25	Neurones dopaminergiques de rat (N27)	LC3, beclin 1	Western-blot, transfection transitoire GFP-LC3	↗ formation d'autophagosomes	(Afeseh Ngwa et al. 2011)
	ZnO NP	50	Macrophages péritonéaux primaires issus de souris Balb/c	LC3, beclin 1, Atg10, Atg12, Atg5, voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR	MET, Western-blot, immunofluorescence, RT-PCR	↗ formation d'autophagosomes via la voie PI3K/Akt/mTOR	(Roy et al. 2014)
	α -Al ₂ O ₃ NP	60	Cellules dendritiques	LC3	MET, immunofluorescence, Western-blot,	↗ formation d'autophagosomes	(Li et al. 2011)
	Quantum dots de CdSe ou de InGaP recouverts de ZnS-PEG	5,1 ± 0,7 3,7 ± 1,4	Cellules rénales du tubule proximal de porc (LLC-PK1)	LC3	MET, Western-blot, lysotracker	↗ formation d'autophagosomes	(Stern et al. 2008)
	Fullerène hydroxylé C ₆₀ (OH) ₂₄	7,1 ± 2,4	Cellules endothéliales humaines (HUVEC)	LC3	MET, Western-blot	↗ formation d'autophagosomes	(Yamawaki and Iwai 2006)
	Fullerène C ₆₀	100	Cellules de gliome de rat (C6)	Aucun	Acridine orange	↗ du nombre de vésicules acides	(Harhaji et al. 2007)

	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
NP CARBONEES	Fullerène C ₆₀ , Dérivé du fullerène C ₆₀ (Nd)	20-100	Cellules cervicales humaines (HeLa) / Fibroblastes embryonnaires primaires de souris (MEF)	LC3	MET, transfection stable GFP-LC3, Western-blot, lysotracker, MDC, mitotracker	↗ formation d'autophagosomes probablement induite par un stress oxydant, colocalisation des autophagosomes avec vésicules acides et mitochondries	(Wei et al. 2010; Zhang et al. 2009b)
	Fullerénol C ₆₀ OH	20	Cellules rénales du tubule proximal de porc (LLC-PK1)	LC3	MET, Western-blot, lysotracker	↗ formation d'autophagosomes et d'autolysosomes, atteinte du cytosquelette, perte du PMM	(Johnson-Lyles et al. 2010)
	Dérivés du fullerène PEG-C ₆₀ et PTX-C ₆₀	79	Neuroblastes murins (Neuro-2A)	LC3	Western-blot	↗ formation d'autophagosomes	(Lee et al. 2011a)
	Oxydes de graphène de deux tailles différentes	Epaisseur = 1-1,2 Diamètre hydrodynamique : 350 et 2400	Macrophages murins péritonéaux (RAW264.7)	LC3, beclin 1	MET, Western-Blot, immunofluorescence	↗ de la formation d'autophagosomes, probablement régulée via la voie de signalisation des TLR	(Chen et al. 2012)
	Quantum dots de graphène	3	Monocytes humains (THP-1)	LC3, beclin 1	Western-blot, kit de détection Cyto-ID	↗ de la formation d'autophagosomes	(Qin et al. 2015)

	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
	Nanotubes de carbone mono-paroi fonctionnalisés COOH-SWCNT, PABS-SWCNT, PEG-SWCNT	4-5 x 1000 1,1 x 750 4-5 x 550	Cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses humaines (A549), poumons de souris Balb/c exposées par instillation intrachéale	LC3, voie de signalisation Akt-TSC2-mTOR	MET, Western-blot, ARNsi beclin 1, ARNsi TSC2, utilisation de 3-MA	↗ de la formation d'autophagosomes via la voie Akt-TSC2-mTOR et ↗ de la mort cellulaire autophagique seulement avec COOH-SWCNT	(Liu et al. 2011)
AUTRES	CeO ₂ NP	10-30	Monocytes du sang périphérique humains	LC3	MET, lysotracker, MDC, immunofluorescence	↗ de la formation d'autophagosomes et du nombre de vésicules acides	(Hussain et al. 2012)
	SiO ₂ NP	62	Cellules endothéliales humaines (HUVEC), Cellules de carcinome hépatique humain (HepG2)	LC3, voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR	MET, Western-blot, MDC	↗ de la formation d'autophagosomes via la voie PI3K/Akt/mTOR	(Duan et al. 2014a; Duan et al. 2014b; Yu et al. 2014)
	Quantum dots de Cd/Se recouverts de ZnS	10 ± 2	Cellules rénales cancéreuses murines (RAG)	LC3	MET, Western-blot, immunofluorescence, transfection transitoire GFP-LC3	↗ de la formation d'autophagosomes	(Luo et al. 2013)
	Nd ₂ O ₃ NP	80	Cellules épithéliales cancéreuses humaines (NCI-H460)	Aucun	MET, acridine orange	↗ de la formation d'autophagosomes et du nombre de vésicules acides	(Chen et al. 2005)

	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
AUTRES	Nano-oxydes de terre rares :						
	Eu ₂ O ₃ NP	50	Cellules cervicales humaines	LC3	MET, transfection stable	↗ de la formation d'autophagosomes	(Yu et al. 2009)
	Sm ₂ O ₃ NP	20	(HeLa)		GFP-LC3, Western-blot		
	Gd ₂ O ₃ NP	100					
	Tb ₂ O ₃ NP	80					
	Dendrimères PAMAM	Aucune donnée	Cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses humaines (A549)	LC3, voie de signalisation Akt-TSC2-mTOR	MET, transfection transitoire GFP-LC3, Western-blot	↗ de la formation d'autophagosomes, via la voie Akt-TSC2-mTOR, ↗ mort cellulaire autophagique	(Li et al. 2009)
	NP polymériques	54,2 ± 6	Macrophages alvéolaires de rat (NR8383)	LC3, Atg16L1	MET, Western Blot, immunofluorescence, micro array, RT-PCR	↗ de la formation d'autophagosomes	(Eidi et al. 2012)

Tableau 2 : Résumé des études décrivant les effets des NP sur l'autophagie sans évaluation du flux autophagique

Abbréviations : 3-MA : 3-méthyladénine ; Ag : argent ; Al : aluminium ; AMPK : *AMP-activated protein kinase* ; Atg : *autophagy related gene* ; Au : or ; CdSe : séléniure de cadmium ; Ce : cérium ; CQ : chloroquine ; Eu : europium ; Fe : fer ; Gd : gadolinium ; GFP : *green fluorescent protein* ; InGaP : indium gallium phosphide ; LC3 : *microtubule associated-protein 1 light chain* ; MDC : monodansylcadaverine ; MET : microscope électronique à transmission ; Mn : manganèse ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; Nd : néodyme ; NP : nanoparticule ; O : oxygène ; PABS : *polyaminobenzene sulfonic acid* ; PAMAM : polyamidoamine ; PEG : polyéthylène glycol ; PMM : potentiel de membrane mitochondrial ; PTX : pentoxifylline ; RT-PCR : *real-time polymerase chain reaction* ; Si : silice ; Sm : samarium ; SV40 : *simian virus 40 large T antigen* ; SWCNT : *single-walled carbon nanotube* ; Tb :terbium ; TLR : *toll-like receptor* ; TSC2 : *tuberous sclerosis complex 2* ;Zn : zinc ; ZnS : sulfure de zinc

1.3.1. NP et flux autophagique

Des analyses plus complètes, étudiant le flux autophagique (Tableau 3), ont démontré que les nanomatériaux comme les NP de TiO₂ (Yu et al. 2015a), d'Au (Ma et al. 2011) ou les CNT (Yu et al. 2013a) pouvaient entraîner une accumulation du nombre d'autophagosomes due à un blocage du flux autophagique. En effet, Yu et ses collègues ont rapporté une augmentation du niveau d'expression de la protéine LC3-II avec une augmentation concomitante du niveau d'expression de la protéine p62 dans des cellules épithéliales bronchiques exposées à des NP de TiO₂ (Yu et al. 2015a). L'accumulation d'autophagosomes, attestée par une augmentation d'expression de LC3-II, associée à l'absence de dégradation de la protéine p62 suggère dans ce cas un blocage du flux autophagique. Par ailleurs, dans une autre étude, Ma *et al* suggèrent que les NP d'Au bloqueraient le processus autophagique via une perturbation de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Ma et al. 2011). De plus, les NP d'Au seraient retrouvées dans les lysosomes, provoquant une alcalinisation du pH lysosomal résultant ainsi en un défaut de fonctionnalité des lysosomes. Bien qu'une inhibition du flux autophagique résultant d'une exposition à plusieurs types de NP ait été démontrée, des cas de stimulation de l'autophagie avec induction du flux autophagique ont également été décrits. C'est notamment le cas pour des quantum dots de graphène dans des cellules gliales humaines où une augmentation de l'expression protéique de LC3-II avec une diminution de l'expression de p62 ont été observés (Markovic et al. 2012). Des résultats similaires (accumulation de LC3-II avec dégradation de la protéine p62 et/ou sur-accumulation de LC3-II en présence d'un inhibiteur de la dégradation lysosomale) ont été décrits pour d'autres nanomatériaux, notamment les NP de TiO₂ (Yu and Li 2011), d'oxydes de Fe (Shi et al. 2015; Yokoyama et al. 2011) ou des nano-oxydes de terre rare (Zhang et al. 2010).

Il est intéressant de noter que certaines études n'ont pas montré d'effet de certains types de NP sur le processus autophagique. Ainsi, bien que dans l'étude de Yu et al, les NP de TiO₂ induisent une augmentation du flux autophagique dans les cellules de glioblastome humain, aucun effet des NP de Zn et de Fe sur l'autophagie n'a été observé (Yu and Li 2011). De même, l'étude de Yu et de ses collègues parue récemment, n'a montré aucun effet des nanotubes de carbone multi-parois fonctionnalisés alors que les mêmes nanotubes non fonctionnalisés induiraient un blocage du flux autophagique dans les poumons de souris exposées (Yu et al. 2013a).

Au regard de la littérature actuelle, et plus particulièrement au moment du commencement de ce travail, il n'était donc pas possible de conclure de façon claire et définitive sur les liens entre NP et autophagie.

	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
NP MÉTALLIQUES	TiO ₂ NP	<25	Cellules de glioblastome humain H4	LC3	Transfection stable GFP-LC3, utilisation d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale (E64d)	↗ formation d'autophagosomes avec ↗ du flux autophagique seulement avec les NP de TiO ₂ . Aucun effet des autres NP sur l'autophagie	(Yu and Li 2011)
	Zn NP	<35					
	Fe NP	<30					
	Différents types de NP :						
	- TiO ₂ NP	- 21	Cellules endothéliales cérébrales humaines (HCEC)	LC3, p62, cathepsines B & D	MET, Western-blot	↗ formation d'autophagosomes et du nombre de lysosomes, notamment avec USPIO non recouverts et les NP de TiO ₂ , ↘ flux autophagique évalué seulement avec USPIO non recouverts	(Halamoda Kenzaoui et al. 2012)
	- Oxydes de fer Fe ₃ O ₄ NP	- 8-9					
	- Superparamagnétique (USPIO) recouverts ou non d'un acide oléique (aminoPVA)	- 25 & 50					
	- 2 NP de Si de tailles différentes						

NP METALLIQUES	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
	TiO ₂ NP	19,3 ± 5,4	Cellules épithéliales bronchiques humaines (16HBE14o-), Poumons de souris A/J exposées par inhalation (6h/j, 5j/semaine pendant 4 semaines)	LC3, p62, beclin 1	Western-blot, immunofluorescence	↗ formation d'autophagosomes avec ↘ du flux autophagique	(Yu et al. 2015a; Yu et al. 2015b)
	NP magnétiques Fe ₃ O ₄ -Au (cœur oxyde de fer recouvert d'or) couplées à un anticorps anti-EGFR	54 ± 11	Cellules épithéliales pulmonaires cancéreuses humaines (HCC827, H520, H1299)	LC3	Transfection transitoire GFP-LC3, Western Blot, utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie (E64d, pepstatin A)	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↗ du flux autophagique dans les lignées exprimant EGFR. Pas d'effet sur l'autophagie des NP seules, non couplées à l'anticorps, ou de l'anticorps seul.	(Yokoyama et al. 2011)
	Fe ₃ O ₄ NP modifiés ou non (avec DA, DMSA ou DA-PAA-PEG)	< 50	Cellules leucémiques humaines (K562, OCI-AML2, OPM2, RPMI-8226, JJN3)	LC3, p62, Atg14, Vps34, mTOR	Western-blot, immunofluorescence, utilisation d'inhibiteur de l'autophagie (Baf A1	↗ formation d'autophagosomes via le complexe beclin1/Atg14/Vps34, ↗ du flux autophagique	(Shi et al. 2015)

		Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
NP MÉTALLIQUES		Au NP de différentes tailles	10, 25 et 50	Fibroblastes de rein de rat (NRK)	LC3, p62, p70S6K	MET, Western-blot, transfection stable GFP-LC3 et RFP-Lamp1, utilisation d'inhibiteur de l'autophagie (CQ), DQ-BSA, LysoSensor	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↘ du flux autophagique, perturbation de la fusion autophagosome-lysosome, dysfonction lysosomale (alcalinisation des lysosomes)	(Ma et al. 2011)
		Nanofils de ZnO	15 x 82	Cellules épidermiques de souris (JB6 CI 41-5A)	LC3, beclin 1, Atg 5	MET, Western-blot, immunofluorescence, transfection transitoire sonde tandem mRFP-GFP-LC3	↗ formation d'autophagosomes avec ↗ du flux autophagique, ↗ mortalité cellulaire autophagique	(Yu et al. 2013b)
		Al ₂ O ₃ NP	8-12	Cellules endothéliales cérébrales humaines (HCMEC/D3), cerveaux de souris C57BL6 exposées par injection via l'artère carotide	LC3, p62	PCR array, Western-blot, MDC, lysotracker, DQ-BSA	↗ formation d'autophagosomes avec ↘ du flux autophagique	(Chen et al. 2013a)
		Quantum dots de graphène GQD	56,6 ± 8,7	Cellules gliales humaines (U251)	LC3, p62	MET, Western-blot, shARN LC3	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↗ du flux autophagique, ↗ de la mort cellulaire autophagique	(Markovic et al. 2012)

	Nanomatériau	Taille (nm)	Modèle expérimental	Marqueurs de l'autophagie étudiés	Techniques expérimentales	Principaux résultats	Référence
NP CARBONEES	Nanotubes de carbone monoparoi fonctionnalisés et oxyde de graphène	1-2 nm de diamètre	Macrophages péritonéaux de souris Kunming	LC3, p62	MET, transfection transitoire GFP-LC3, Western-blot, lysotracker, dextran-FITC	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↘ du flux autophagique, déstabilisation de la membrane lysosomale	(Wan et al. 2013)
	Nanotubes de carbone multiparois fonctionnalisés (TMWCNT) ou non (PMWCNT) avec un groupement acide	PMWCNT : 13,5 x 7710 TMWCNT : 7,5 x 567,4	Poumons de souris C57BL/6 exposées par instillation intratrachéale unique	LC3, p62, beclin 1, LAMP2	Immunofluorescence, Western-blot	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↘ du flux autophagique seulement avec PMWCNT	(Yu et al. 2013a)
AUTRES	Nano-oxydes de terre rares : Y ₂ O ₃ NP Yb ₂ O ₃ NP La ₂ O ₃ NP	<50	Cellules cervicales humaines (HeLa)	LC3, Atg5, p62	MET, transfection stable GFP-LC3, Western-blot MDC, lysotracker	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↗ du flux autophagique	(Zhang et al. 2010)
	Dendrimères PAMAM	Aucune donnée	Cellules de glioblastomes humains (U87MG, U251MG)	LC3, voie de signalisation Akt/mTOR	MET, Western-blot, kit de détection Cyto-ID, lysotracker, utilisation d'inhibiteur de l'autophagie (3-MA, Baf A1, CQ)	↗ de la formation d'autophagosomes avec ↗ du flux autophagique	(Wang et al. 2014)

Tableau 3 : Résumé des études décrivant les effets des NP sur l'autophagie avec évaluation du flux autophagique

Abbréviations : 3-MA : 3-méthyladénine ; Al : aluminium ; Atg : *autophagy related gene* ; Au : or ; Baf A1 : Bafilomycine A1 ; CQ : chloroquine ; DA : dopamine ; DMSA : *dimercaptosuccinic acid* ; EGFR : *epidermal growth factor receptor* ; FITC : *fluorescein isothiocyanate* ; GFP : *green fluorescent protein* ; GQD : *graphene quantum dots* ; La : lanthane ; LC3 : *microtubule associated-protein 1 light chain* ; MDC : monodansylcadaverine ; MET : microscope électronique à transmission ; Mn : manganèse ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; MWCNT : *multi-walled carbon nanotube* ; NP : nanoparticule ; O : oxygène ; PAA : acide polyacrylique ; PABS : *polyaminobenzene sulfonic acid* ; PAMAM : polyamidoamine ; PEG : polyéthylène glycol ; PMWCNT : *pristine MWCNT* ; RT-PCR : *real-time polymerase chain reaction* ; Si : silice ; Ti : titane ; TMWCNT : *treated MWCNT* ; USPIO : *ultrasmall superparamagnetic iron oxide* ; Vps34 : *vacuolar protein sorting 34* ; Y : yttrium ; Yb : ytterbium ; Zn : zinc

1.4. Synthèse du chapitre

Nous avons vu dans ce chapitre que les nanoparticules manufacturées présentent un grand intérêt scientifique et technologique, de par l'acquisition de nouvelles propriétés de la matière à l'échelle nanométrique. La production et l'utilisation croissante des nanoparticules dans des produits de consommation courante participent à une éventuelle dissémination dans l'environnement qui pourrait conduire à une exposition humaine de plus en plus importante. Cette éventuelle exposition aux nanoparticules suscite de plus en plus d'inquiétudes quant à leurs effets sur la santé, notamment au niveau respiratoire, principale voie d'exposition aux nanoparticules. Plusieurs études ont montré que l'exposition aux nanoparticules pouvait induire des phénomènes de remodelage pulmonaire chez l'animal ou *in vitro* sur des cultures cellulaires. Toutefois, ces résultats ne sont pas toujours vérifiés selon les nanoparticules étudiées et semblent dépendre notamment de leurs caractéristiques physico-chimiques. Par ailleurs, bien que le stress oxydant et l'induction d'une réponse pro-inflammatoire soient les deux principaux mécanismes décrits comme responsables de la toxicité des nanoparticules, les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette toxicité ne sont pas encore totalement élucidés. L'autophagie est un processus physiologique permettant, entre autres, la dégradation de composants cellulaires. De nombreuses études suggèrent un rôle clé de l'autophagie dans la pathogenèse et/ou le développement de pathologies humaines, notamment dans le cas de maladies pulmonaires comme la BPCO, l'HTAP ou la mucoviscidose. Le rôle de l'autophagie dans ces différentes pathologies pourrait être lié à sa capacité à moduler les réponses inflammatoires et oxydantes associées à ces pathologies. L'inflammation et le stress oxydant étant les deux mécanismes principalement décrits comme sous-jacents aux effets des nanoparticules et celles-ci ayant la capacité de s'accumuler dans les lysosomes, organites fonctionnels de l'autophagie, une dérégulation du processus autophagique pourrait représenter un bon candidat pour expliquer, du moins en partie, la toxicité des nanoparticules. Une compréhension plus approfondie des mécanismes sous-jacents impliqués dans cette interaction entre nanoparticules et autophagie est nécessaire pour aider au développement de nanomatériaux plus sûrs.

2. Objectifs et démarche de l'étude

L'objectif général de cette thèse est de comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets des NP, en s'intéressant tout particulièrement à l'autophagie. Nous nous sommes concentrés sur les NP de TiO_2 au vu de leur production et de leur utilisation conséquente dans l'industrie actuellement. Les objectifs spécifiques de ce travail sont d'évaluer les effets des NP de TiO_2 sur l'autophagie et sur d'autres réponses biologiques (stress oxydant et inflammation notamment) aux NP, tout en évaluant l'impact potentiel de leurs caractéristiques physico-chimiques (composition chimique, taille, forme, structure cristalline ...) sur chacun de ces paramètres, afin d'identifier de façon plus précise les paramètres physico-chimiques entraînant des réponses cellulaires délétères.

Pour répondre à ces objectifs, les effets de plusieurs nanoparticules, différant chacune d'un paramètre physico-chimique (1 nanoparticule de noir de carbone et 7 particules de TiO_2) ont été évalués dans une lignée de macrophages murins.

CHAPITRE 3

3. Matériels et méthodes

3.1. Caractérisation des nanoparticules étudiées

Les différentes particules utilisées ont été caractérisées de façon approfondie en utilisant les méthodes suivantes.

3.1.1. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission permet d'étudier la forme des particules mais aussi leur taille et leur état d'agglomération.

Protocole

Les NP ont été dispersées à 100 µg/ml dans de l'eau distillée par sonication au Vial Tweeter (Hielscher, Allemagne). Une goutte de cette suspension a été déposée sur une grille recouverte d'un film carbone fin (type « Lacey Carbon Film on 300 mesh copper ») puis séchée à l'air avant d'être observée. L'appareil utilisé est un microscope Philips CM12 (plateforme TEM-Team CEA/DSV, Saclay). Les observations ont été réalisées à un grossissement compris entre 100000 et 150000, sous une tension d'accélération maximale de 120 kV.

3.1.2. Microscopie électronique à balayage associée à la microanalyse par énergie dispersive des rayons X

La microscopie électronique à balayage (MEB) associée à la microanalyse par énergie dispersive de rayons X (EDX) est une technique permettant une analyse locale ou globale des matériaux. Cette technique permet de visualiser la morphologie des particules (MEB) mais aussi la composition chimique de la surface examinée grâce à l'analyse cartographique (EDX).

Principe

La rencontre entre le faisceau électronique incident du MEB et les atomes de la surface de l'objet génère des photons X, captés par un détecteur. Le rayonnement émis lors de l'interaction entre les rayons et la matière de l'échantillon est retranscrit sous forme de spectre, où apparaissent des pics d'intensité variable, caractéristiques des éléments métalliques ou minéraux en présence. Il est donc possible de procéder à une analyse chimique qualitative et quantitative localisée de la surface d'un échantillon.

Protocole

Une pointe de poudre de NP est fixée sur un plot de MEB à l'aide de scotch carbone double face puis la poudre est directement observée au MEB. L'appareil utilisé est un MEB Carl Zeiss Ultra 55 à émission de champ (Carl Zeiss, Allemagne) couplé à un système de microanalyse X (Bruker, Allemagne). Les observations ont été réalisées à 3kV, à un grossissement compris entre 20000 et 200000.

3.1.3. Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) est une méthode utilisée pour identifier la nature et la structure de produits cristallins, c'est-à-dire présentant un arrangement périodique et ordonné des atomes dans des plans réticulaires tridimensionnels. Les particules de TiO_2 présentant plusieurs structures cristallines (anatase et rutile principalement), cette technique a été utilisée pour pouvoir les identifier.

Principe

L'état cristallin est caractérisé par la répartition tripériodique dans l'espace d'un motif atomique. Lorsque les rayons X frappent un morceau de matière, ils sont diffusés par chacun des atomes de l'objet. Ces rayons X diffusés interfèrent entre eux. Si les atomes sont ordonnés, ce qui est le cas dans un cristal, les interférences vont être constructives dans certaines directions (les ondes s'additionnent) et destructrices dans d'autres (les ondes s'annulent). C'est le phénomène de diffraction (Figure 15).

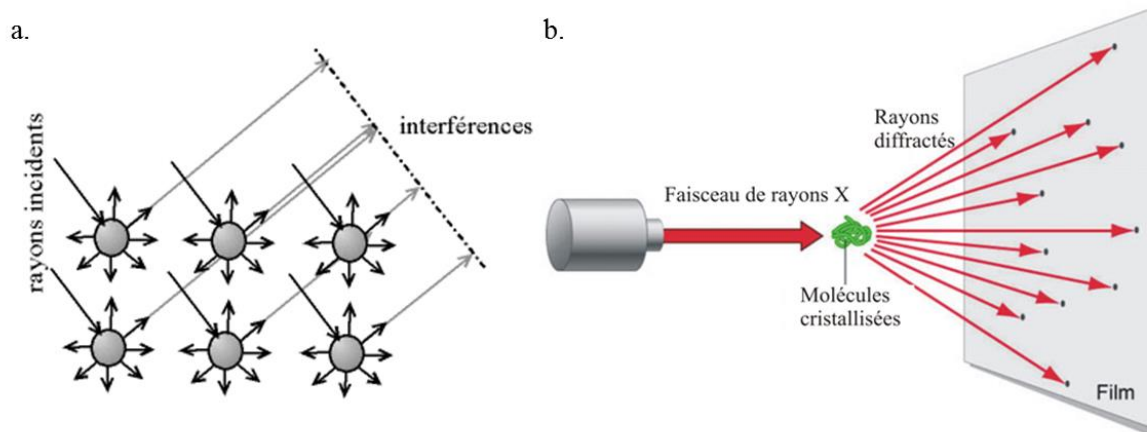


Figure 15 : Principe de l'analyse par diffraction des rayons X. a. Interférences des ondes diffusées. b. Diffraction des rayons X d'un cristal.

Un détecteur de rayons X va ensuite mesurer l'intensité des rayons X diffractés dans certaines directions. L'enregistrement réalisé permet d'obtenir un diffractogramme qui est une courbe représentant l'intensité des rayons X en fonction des angles de diffraction (Figure 16). Une fois le diagramme obtenu, on compare les positions et les intensités des pics observés avec ceux de la base de données de l'ICDD (*International Centre for Diffraction Data*) qui contient plus de 600000 diagrammes de référence.

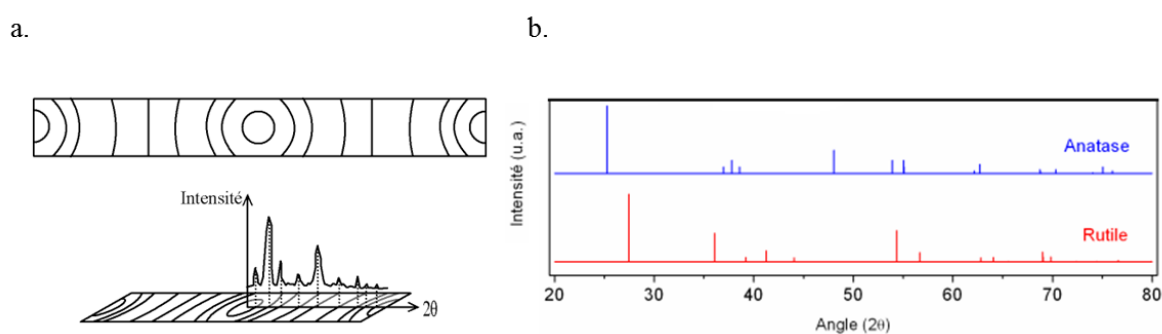


Figure 16 : Enregistrements obtenus après analyse. a. Données obtenues par diffraction des rayons X. b. Diffractogrammes théoriques du dioxyde de titane.

Protocole

Les échantillons sous forme de nanopoudres ont été analysés à l'aide d'un diffractomètre de type Siemens D5000 en géométrie de Bragg-Brentano. Les diffractogrammes ont été enregistrés

à température ambiante pour un angle d'incidence 2θ variant de 20 à 80°, avec un temps de mesure de 7 secondes et un pas de 0,04 (2 θ). Le traitement des diffractogrammes a été réalisé avec le logiciel EVA.

3.1.4. Détermination de la surface spécifique

La surface spécifique désigne la superficie réelle de la surface d'un objet, c'est-à-dire la quantité de surface totale accessible par unité de masse d'un objet.

Principe

Cette technique est basée sur la théorie de l'adsorption physique à basse température développée par Brunauer, Emmett et Teller (BET). Cette théorie permet, à l'aide du volume de gaz adsorbé par une particule en poudre, de calculer le volume de gaz adsorbé, en monocouche, à la surface de l'échantillon. L'aire de cette monocouche, qui correspond à la surface de l'échantillon, est alors calculée sur la base de l'aire d'une molécule du gaz utilisé et de la formule suivante :

$$S = \frac{N_A \times V_{\text{monocouche}} \times A_{\text{gaz}}}{V_M}$$

Avec : S la surface totale de l'échantillon en m², N_A le nombre d'Avogadro, V_{monocouche} le volume de la monocouche adsorbé en m³, A_{gaz} l'aire d'encombrement du gaz en m², et V_M le volume molaire en m³.

Pour connaître la surface spécifique, il suffit alors de diviser la surface de l'échantillon par sa masse (en g).

Protocole

Les mesures ont été réalisées sur un analyseur Micromeritics Flowsorb 2300 (Norcross, Etats-Unis). L'échantillon est d'abord pesé puis dégazé sous vide pendant une heure à 150°C afin d'éliminer les molécules qui se seraient déposées à la surface de l'échantillon. Celui-ci est ensuite refroidi à 77 K et un flux d'azote/hélium à un rapport 30/70 est alors injecté pour se fixer à la surface de l'échantillon. L'échantillon est alors réchauffé pour libérer le gaz adsorbé dont le volume est mesuré. L'appareil en déduit le volume adsorbé en monocouche selon la théorie de BET et ainsi la surface spécifique de l'échantillon. La précision sur les mesures de surface spécifique est de 3%.

3.1.5. Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta ζ représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure quand elle est en suspension. La valeur de cette charge permet de comprendre et de prédire les interactions des particules en suspension et est donc un excellent indicateur de la stabilité des particules en suspension

Définition

En général, une particule est chargée négativement et est donc entourée d'ions chargés positivement. En s'éloignant, dans la couche diffuse, le potentiel varie pour finalement atteindre la neutralité. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du plan de cisaillement de la particule, c'est-à-dire au niveau de la limite à partir de laquelle le liquide qui entoure la particule ne la suivra pas si celle-ci se déplace (Figure 17).

En pratique, plus ce potentiel est élevé en valeur absolue, plus la charge de la particule s'intensifie. Ainsi, les particules chargées se repoussent les unes des autres lorsqu'elles sont proches évitant alors l'agglomération des particules et assurant donc la stabilité de la suspension. Au contraire, si le potentiel zêta est faible en valeur absolue, les particules seront alors moins chargées. Les probabilités de collision seront accrues, ce qui aura pour conséquence une diminution de la stabilité de la solution. Le potentiel zêta est donc un bon indicateur de la stabilité des particules en suspension. On considère qu'une suspension est stable lorsque $\zeta > |30|$ mV.

Le principal paramètre influençant le potentiel zêta est le pH. En effet, lorsque celui-ci devient acide, les particules ont tendance à acquérir des charges positives. Au contraire, si le pH devient basique, les particules auront tendance à acquérir des charges négatives. On définit alors un pH pour lequel le potentiel zêta de la particule est nul : c'est le point isoélectrique pI.

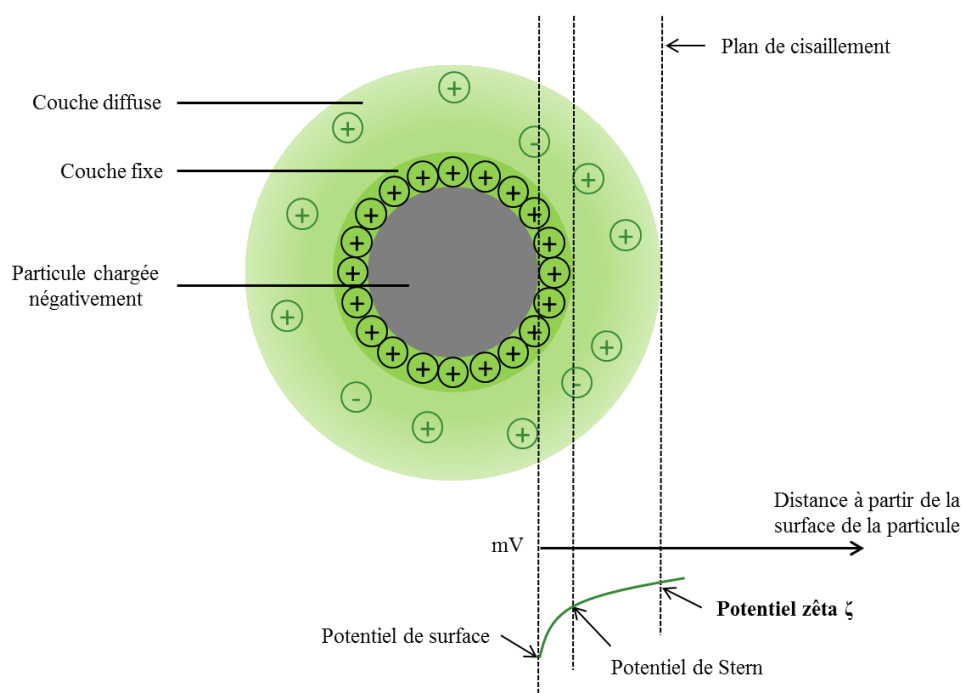


Figure 17 : Charges et potentiels d'une particule

Principe

Un champ électrique est appliqué sur la suspension de NP. Celles-ci vont alors se déplacer à une vitesse qui est directement liée à leur potentiel zêta. Cette vitesse est ensuite mesurée grâce à la technique de la vélocimétrie laser Doppler, technique optique reposant sur la mesure du décalage en fréquence de faisceaux laser éclairant une suspension.

Protocole

Les NP ont été dispersées à 1 mg/ml dans de l'eau distillée à pH 7 par sonication dans un bac à ultrasons pendant 15 minutes. Les NP sont ensuite directement injectées dans l'appareil pour les mesures. L'appareil utilisé est le ZetaSizer HS 3000 (Malvern, UK).

3.1.6. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière, aussi appelée spectroscopie par corrélation de photons ou quasi élastique de la lumière, est une technique permettant de déterminer le diamètre hydrodynamique d'une particule, autrement dit, la taille des particules en suspension. Ce diamètre est généralement supérieur à celui mesuré en microscopie électronique étant donné

que le diamètre hydrodynamique prend en compte la particule entourée de sa couche diffuse (ou couche de solvation) (Figure 17). Cette technique, couplée à des mesures de particules primaires par MET, permet ainsi de connaître l'état d'agglomération des particules en suspension.

Principe

Lorsqu'une suspension colloïdale est traversée par un faisceau laser incident, une partie de ce signal lumineux est diffusée dans toutes les directions. Le signal lumineux diffusé est alors collecté sur un détecteur à un angle donné. L'intensité du faisceau diffusé par les particules va varier au cours du temps en raison du mouvement brownien des particules (mouvement thermique aléatoire des particules immergées dans un fluide). Ce mouvement aléatoire est modélisé par la relation de Stokes-Einstein qui permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique à partir du coefficient de diffusion transversal calculé via le signal optique recueilli par le détecteur.

Protocole

Les NP ont été dispersées à 1 mg/ml dans de l'eau distillée à pH 7 par sonication dans un bac à ultrasons pendant 15 minutes. La solution a ensuite été diluée à 0,2 mg/ml et directement mise dans la cuve pour mesure. L'appareil utilisé est le granulomètre ZetaSizer HS 3000 (Malvern, UK). Dans le cadre de cette étude, l'ajustement des fonctions d'autocorrélation a été effectué par l'algorithme de CONTIN, présentant la plus grande polyvalence et une grande précision.

3.1.7. Dosage des endotoxines

Les endotoxines sont des toxines situées dans la membrane externe de certaines bactéries Gram négatives, qui peuvent être libérées dans l'environnement lors de la lyse de ces bactéries. Les endotoxines, et notamment le LPS, à forte concentration, sont reconnues comme étant des pyrogènes puissants et pouvant induire des réponses inflammatoires (Liebers et al. 2008). Les NP peuvent être contaminées avec des endotoxines lors de leur production ou de leur traitement, particulièrement quand celles-ci n'ont pas été conservées dans des

conditions stériles. La présence d'endotoxines dans les suspensions de NP a donc été vérifiée afin de distinguer la toxicité spécifique potentielle des NP des effets des endotoxines.

Protocole

Les NP ont été diluées à 100 µg/ml dans de l'eau ultrapure et soniquées 15 minutes. Après 12h d'incubation à 37°C, les NP en solution ont été centrifugées deux fois 10 minutes à 6000 rpm. Les surnageants ont été récupérés et la présence d'endotoxines évaluée à l'aide du kit QCL-1000 Chromogenic LAL (Lonza, Suisse), conformément à la norme ISO publiée en 2010 sur l'évaluation des nanomatériaux destinés à des tests biologiques *in vitro* (ISO/FDIS 29701: Nanotechnologies - Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems - Limulus amoebocyte lysate (LAL) test. 2010). L'absorbance a été mesurée à 405 nm par spectrophotométrie (Infinite® 200 Pro, Tecan, Suisse).

3.1.8. Production intrinsèque de ROS

Les NP peuvent générer des ROS en conditions acellulaires, via leur capacité intrinsèque de catalyse de réactions d'oxydo-réduction à leur surface (Manke et al. 2013). La surface des NP peut ainsi être associée avec des radicaux libres ou des groupements oxydants tels que O_2^- ou OH^- pouvant induire une cytotoxicité.

Cette capacité des particules à générer des ROS de façon intrinsèque a été mesurée en utilisant un plasmide bactérien : le plasmide Φ X174 RF1 (Donaldson et al. 1995). En effet, l'ADN du plasmide se trouve sous forme superenroulée. L'exposition de cet ADN à des ROS induit une rupture des liens qui maintenaient la structure superenroulée, et ainsi permet à l'ADN de se retrouver sous forme désenroulée, voire sous forme linéaire. Une migration sur gel permet de séparer les différentes formes de l'ADN plasmidique (circulaire superenroulé, circulaire relâché ou linéaire) pour ensuite les quantifier.

Protocole

Les NP diluées à 100 µg/ml dans de l'eau distillée ont été mises en présence de 290 ng d'ADN du plasmide Φ X174 RF1 (Thermo Fisher Scientific, Etats-Unis) pendant 8 heures à 37°C au bain marie. L'ADN du plasmide traité par une endonucléase de restriction Pst1 (15 unités, Life Technologies, Etats-Unis), a été utilisé comme témoin positif de la linéarisation

du plasmide. Après incubation, une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% à 30V a été réalisée sur la nuit à 4°C.

3.2. Etudes *in vitro*

3.2.1. Culture cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé dans cette étude est la lignée RAW264.7 (ATCC, Etats-Unis). Il s'agit de macrophages isolés d'une tumeur induite par le virus de la leucémie murine d'Abelson issue d'une souris adulte mâle de fond génétique BALB/c. Cette lignée est classiquement utilisée pour les études en toxicologie pulmonaire étant donné que les macrophages représentent, *in vivo*, une des premières lignes de défense contre des éléments étrangers à l'organisme comme les bactéries et les virus mais aussi les nanoparticules (Oberdorster et al. 2005). De plus, ces cellules jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines.

Conditions de culture

Les cellules sont cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM, high glucose, GlutaMax supplement, pyruvate, Life Technologies, Etats-Unis) supplémenté avec 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine 100X, Life Technologies) et 10% de sérum de veau fœtal (SVF, HyClone, Royaume-Uni). Elles sont maintenues sous incubation à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 5% de CO₂. Les cellules sont repiquées deux fois par semaine lorsqu'elles atteignent 80% de confluence. Dans cette étude, toutes les expériences ont été réalisées entre le 2^{ème} et le 15^{ème} passage des cellules.

3.2.2. Exposition des cellules aux particules

Les particules en poudre ont été mises en suspension dans du DMEM sans SVF à une concentration de 2 mg/ml puis dispersées par sonication dans un bain à ultrasons pendant 15 minutes. Les suspensions obtenues ont ensuite été aliquotées et congelées à -20°C à l'abri de la lumière.

Selon les expériences, les cellules ont étéensemencées dans des puits de différentes surfaces. Le nombre de cellules ainsi que le volume de culture sont adaptés en fonction de la surface

occupée par les cellules afin que la quantité de particules à laquelle les cellules sont exposées reste constante. Ainsi, nous utilisons 200 µl de milieu par cm² de surface.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules ont été exposées aux NP. Tout d'abord, les cellules ont été rincées avec du milieu DMEM sans SVF afin d'éliminer toute trace de ce dernier. En effet, le SVF est connu pour être un agent dispersant des NP, réduisant ainsi la taille des agrégats de NP et affectant alors leur capture par les cellules mais aussi leurs potentiels effets toxiques (Elgrabli et al. 2007; Tedja et al. 2012). Afin d'observer seulement les effets des NP non modifiés (sans adsorption des composants du SVF à la surface des NP), nous avons choisi de traiter les cellules sans SVF. Les particules provenant des aliquots à 2 mg/ml ont été soniquées au bain à ultrasons pendant 15 min puis diluées dans du milieu DMEM sans SVF pour atteindre la concentration finale désirée (de 1 µg/ml à 100 µg/ml).

Dans certaines expériences, les cellules ont été traitées avec différents agents pharmacologiques utilisés comme contrôles : rapamycine (Sigma Aldrich, Etats-Unis) à une concentration de 100 nM ou LPS (Sigma Aldrich) à 10 µg/ml pendant la durée du traitement. Les cellules ont également pu être traitées deux heures avant la fin du traitement avec de la bafilomycine A1 (Sigma Aldrich) à une concentration de 100 nM, de la chloroquine (Sigma Aldrich) à 100 µM ou du nocodazole (Sigma Aldrich) à 15 µg/ml.

3.2.3. Evaluation de la viabilité cellulaire

3.2.3.1. Test WST-1

Le test WST-1 permet d'évaluer la viabilité cellulaire en mesurant l'activité d'une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Principe

Le *Water Soluble Tetrazolium Salt- 1* (WST-1) est un sel de tetrazolium de couleur rouge clair. Sous l'action des succinates déshydrogénases de la chaîne respiratoire, le WST-1 de couleur rouge clair est réduit en formazan de couleur rouge foncé (Figure 18). La quantité de formazan formé est alors déterminée en mesurant l'absorbance de la solution. Les enzymes

n'étant actives que dans les cellules vivantes, l'intensité de la coloration est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

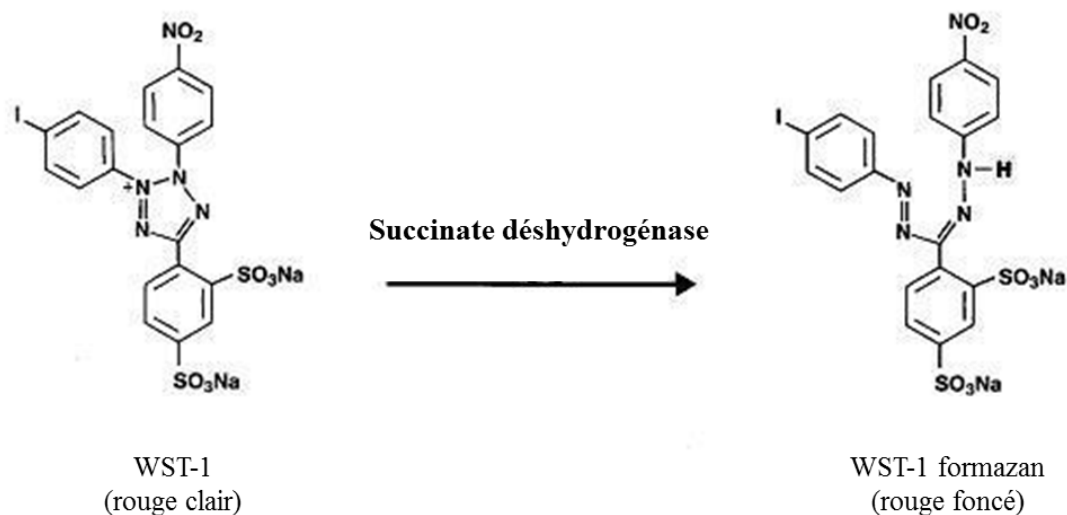


Figure 18 : Principe du test WST-1

Protocole

Après exposition cellulaire aux NP, le milieu de culture a été retiré puis les cellules ont été rincées dans du milieu DMEM sans rouge phénol ni SVF. 100 µl de la solution de WST-1 (Roche Diagnostics, Suisse), préalablement diluée au 1/10^{ème} dans du milieu DMEM sans rouge phénol, ont été déposés dans chaque puits. Après une incubation de 2 heures à 37°C, l'absorbance a été mesurée à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Infinite® 200 Pro, Tecan). Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules non traitées (condition contrôle).

3.2.3.2. Quantification de l'ADN

Principe

La méthode mise en œuvre ici permet de quantifier l'ADN des cellules par fluorescence et permet donc de rendre compte de la quantité de cellules vivantes. Cette méthode utilise une molécule fluorescente, molécule passant la membrane cellulaire, et ayant la particularité de se

fixer à l'ADN des cellules vivantes : la molécule Hoechst 33258. L'intensité de fluorescence est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Protocole

Après exposition des cellules aux NP, le milieu de culture a été retiré puis les cellules ont été rincées dans du PBS (Phosphate Buffer Saline, Life Technologies). Cinquante microlitres d'eau distillée stérile ont alors été déposés dans chaque puits afin de lyser les cellules. Après une incubation d'une heure à 37°C, 200 µl de solution Hoechst à 2 µg/ml (DNA quantification kit fluorescence assay, Sigma Aldrich) ont été ajoutés dans chaque puits. La lecture de la fluorescence se fait immédiatement à l'aide d'un lecteur de plaque à fluorescence (Infinite® 200 Pro, Tecan) avec une longueur d'onde d'excitation à 360 nm et d'émission à 460 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules non traitées (condition contrôle).

En raison de leurs propriétés physico-chimiques, notamment leur capacité d'adsorption et leur activité optique, les NP peuvent interférer avec les tests de cytotoxicité classiques et ainsi conduire à une mauvaise estimation de la toxicité cellulaire (Kroll et al. 2012). Ainsi, nous avons vérifié l'absence d'interférences entre les particules utilisées dans cette étude et les deux tests de cytotoxicité utilisés dans cette étude. Pour ce faire, les particules ont été mises en contact avec le réactif en absence de cellules, et l'absorbance/fluorescence de cellules exposées aux NP en absence du réactif a également été mesurée. Aucune interférence n'a été observée.

3.2.4. Observations cellulaires : microscopie électronique à transmission

L'observation des cellules en microscopie électronique permet de visualiser le contenu intracellulaire des macrophages murins après exposition aux NP et, notamment, d'observer la localisation intracellulaire des particules.

Protocole

Fixation des cellules

Après exposition des cellules à 50 µg/ml de NP pendant 6 heures, les cellules, adhérentes au fond d'une boîte de Pétri, ont été rincées avec du milieu DMEM sans sérum, puis fixées *in situ* avec une solution de glutaraldéhyde 2% dans du tampon cacodylate de sodium (0,1M à pH 7,4) pendant une heure. L'ajout de fixateur permet de conserver l'état morphologique des cellules à un moment donné. Une fois fixées, les cellules ont été lavées trois fois dans ce même tampon pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été post-fixées avec du tétraoxyde d'osmium 1% pendant une heure. Cette double fixation permet une meilleure préservation des structures cellulaires. Enfin, les cellules ont été lavées trois fois dans le tampon cacodylate pendant 10 minutes, puis deux fois 10 min dans de l'eau distillée.

Inclusion des cellules dans la résine EPON

Afin d'obtenir une pénétration optimale de la résine dans les cellules, celles-ci ont subi des étapes de déshydratation successives dans des bains d'éthanol de concentration croissante : 3 fois 5 min dans de l'éthanol 50%, 3 fois 5 min dans de l'éthanol 70% puis 3 fois 10 min dans de l'éthanol 100%. Les boîtes de Pétri ont ensuite été remplies de résine EPON (Epoxy embedding medium kit, Sigma Aldrich) composée de base (Epoxy 48,3%), anhydrides durcisseurs (Dodecenyl Succinic Anhydride 17,5% et Nadic Methyl Anhydride 32,9%) et accélérateur (Diméthylamino Methyl Phenol-30 1,3%). L'imprégnation des cellules par la résine a été faite lentement dans une étuve sèche à 37°C pendant 24 heures. La polymérisation de la résine a été réalisée le jour suivant, par transfert dans une étuve sèche à 60 °C pendant 48 heures minimum (jusqu'à durcissement complet de la résine).

Préparation des coupes

Les coupes ultrafines (90 nm) ont été réalisées à la plateforme de microscopie Imagif du CNRS, à Gif-sur-Yvette. Elles ont été effectuées à l'aide d'un ultramicrotome équipé d'un couteau à diamant. Les coupes ont ensuite été colorées afin d'augmenter le contraste des composants cellulaires sur la coupe. La coloration se fait à l'aide d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb, solutions métalliques susceptibles de laisser des dépôts sur la coupe.

Observation au microscope électronique

Les observations des coupes ont été réalisées avec un microscope JEOL 1400 (JEOL, Japon) équipé d'une caméra numérique, à une tension de 80kV, à la plateforme de microscopie Imagif du CNRS. L'observation a porté sur la totalité des cellules présentes sur une coupe.

3.2.5. Détermination de la transcription des gènes par qPCR

Principe

La qPCR, ou PCR quantitative est une technique permettant de quantifier l'expression d'un gène donné, dans une condition donnée, à partir de l'ARN correspondant. Cette technique couple une RT-PCR classique à une méthode de quantification fluorescente. Les ARN totaux extraits d'un échantillon vont tout d'abord être rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une transcriptase inverse. L'ADNc est alors amplifié au cours de la PCR quantitative où l'on peut suivre en temps réel la synthèse des fragments d'ADN grâce à une sonde qui fluoresce seulement lorsqu'elle est fixée à l'ADN. L'intensité du signal fluorescent est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au cours de l'amplification. Ainsi, plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faut de cycles d'amplification pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond (point défini comme le Ct, threshold cycle).

Protocole

Extraction des ARN totaux à partir de cellules

Après exposition des cellules à 50 µg/ml de NP pendant 6h, les cellules ont été rincées 3 fois dans du PBS. L'extraction des ARN totaux a été effectuée à l'aide du kit RNeasyprotect Mini Kit (Qiagen, Pays-Bas) conformément aux instructions du fournisseur. Après extraction, la concentration en ARNs totaux de chaque échantillon est dosée au nanodrop (Nanodrop ND1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Parallèlement, l'intégrité et la pureté des ARN sont contrôlées au Bioanalyseur (2100 Bioanalyser, Agilent Technologies, Etats-Unis) via la mesure du *RNA integrity number* (RIN). Il s'agit d'une valeur correspondant au ratio des ARN 28S et 18S, témoignant de la non dégradation de l'ARN, cette valeur devant être la plus proche possible de 10. Les ARN totaux sont conservés à -80°C.

Obtention des ADNc par rétro-transcription

La transcription inverse permet la synthèse du premier brin d'ADNc. Cette réaction s'effectue à partir de 2 µg d'ARN totaux mis dans un mélange contenant 0.4 µl d'oligo(dT) (Promega, Madison, Etats-Unis), 0,4 µl de random hexamer (Promega) et de l'eau DNase/RNase free pour un volume final de 28 µl. Ce mélange est ensuite incubé 2 min à 70°C dans un thermocycleur (TGradient, Biometra, Goettingen, Allemagne) afin de dénaturer les structures secondaires de l'ARN, puis refroidi immédiatement dans la glace. La transcription inverse est réalisée en ajoutant, au mélange initial, 2 µl de transcriptase inverse MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Life Technologies), 2 µl de dNTP (Life Technologies), 10 µl de tampon MMLV 5X (Life Technologies) et 5 µl d'eau DNase/RNase free. Le mélange est ensuite chauffé 2h à 37°C puis 10 min à 70°C. A la fin de l'incubation, les produits de la réaction sont conservés à -20°C.

Des contrôles internes contenant tous les composants de la réaction exceptés les ARN initiaux ou exceptée l'enzyme de rétro-transcription sont réalisés pour chaque rétro-transcription afin de tester une contamination éventuelle en ADN génomique.

qPCR

Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés en utilisant le kit Sybr Select Master Mix (Life Technologies). Pour ce faire, un volume de 2 µl d'ADNc dilué à 5 ng/µl a été ajouté à 5 µl du mix contenant du SybrGreen (molécule fluorescente lorsqu'elle est liée à l'ADN), la polymérase, du ROX (fluorochrome passif permettant de normaliser les résultats), 0,4 µM de chacune des amorces spécifiques de la séquence d'ADN à amplifier et de l'eau DNase/RNase free afin d'obtenir un volume total de 10 µl.

La PCR est ensuite réalisée sur un appareil pour PCR quantitative QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Life technologies) et se déroule en plusieurs étapes :

- 2 min à 50°C permettant l'activation de l'enzyme UDG (Uracil DNA glycosylase), qui élimine les bases uracile pouvant être contenues dans l'ADN, prévenant ainsi toute contamination de la PCR.
- 2 min à 95°C permettant l'activation de la polymérase, nécessaire à la synthèse des nouveaux brins d'ADN
- 40 cycles composés de 1 s à 95°C et de 30s à 60°C pendant lesquels s'effectue l'amplification de la séquence correspondant aux amorces choisies

- Puis, 15 s à 95°C, suivies de 1 min à 60°C et de 15 s à 95°C. Cette étape supplémentaire, programmée en fin d'amplification, permet de dissocier l'ADN et ainsi de vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié.

Les séquences des amorces utilisées pour ce travail sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 4).

Gène	Numéro d'accès GenBank	Séquences des amorces (5'→ 3')	
		Sens	Anti-sens
AIP	NM_016666.2	CCTGTGTGGGAGACCATCGT	CGATGTTGCGGAGGCTCTT
SF3A1	NM_026175	CCACTGAGTCCAAACAGCCAAT	AGCTTCAAATTCAGGCCCAT
ATG4 B	Qiagen		
CTSB	NM_007798.3	GTACTTAGGAGTGCACGGGA	ATCAAGGACCACCACATCCTG
LAMP 1	NM_010684.2	CCTACGAGACTGCGAATGGTT	TGTGAGGCTGGGGTCAGAAA
LAMP 2	NM_0010179 59.2	ATGCCCCTCTGGGAAGTTCT	TATGATGGCGCTTGAGACCA
LC3b	NM_026160.4	TGACCCAGCTTAAGCGACTG	GTGAGCCAAGTCTGGAGCAT
p62	Qiagen		
Stx17	Qiagen		
Snap29	Qiagen		
TFEB	Qiagen		
Vamp8	Qiagen		
IL-1 β	NM_008361.3	TGAGAATGACCTGTTCTTTGAAGTT G	GACAGCCCAGGTCAAAGGTTT
IL-6	NM_031168.1	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGAG ATACAG	TGAATTGGATGGTCTTGGTCCTT AGCCAC
IL-18	NM_008360.1	CAACTTTGGCCGACTTCACTG	TCAGTCTGGTCTGGGGTTCA
MCP-1	NM_009140.2	CTCTCAAGGGCGGTCAAAAA	CAGTTAGCCTTGCCCTTTGTTCA
NLRP 3	Qiagen		
TNF- α	NM_013693	CCACCACGCTCTTCTGTCTACTGAA CTT	GTGGGCTACAGGCTTGTCACCTCG
HO-1	NM_010442	GGCCACCAAGGAGGTACACAT	TGGGGCATAGACTGGGTTCT
SOD-1	Qiagen		
SOD-2	Qiagen		

Tableau 4 : Séquence des amorces des différents gènes étudiés

L'expression des gènes d'intérêt a été déterminée directement à partir des Ct sur le logiciel QuantStudio Real-Time PCR (Life technologies) grâce à la méthode des $\Delta\Delta C_t$. Il s'agit de comparer les valeurs de Ct des échantillons d'intérêt avec un échantillon calibrateur qui sera le même pour toutes les PCR (ici, il s'agit d'un mélange de tous les échantillons étudiés). Les valeurs de Ct du calibrateur et des échantillons d'intérêt sont normalisées par l'utilisation d'un gène de référence, exprimé de façon constante dans les différentes conditions expérimentales. Pour ce travail, nous avons choisi deux gènes de référence : AIP et SF3A1.

3.2.6. Détermination de l'expression des protéines

3.2.6.1. Western-blot

Principe

Le Western-blot, également appelé immunoblot, est une technique permettant la détection de protéines spécifiques sur une membrane. Cette technique se déroule en plusieurs étapes. En premier lieu, les protéines sont mises dans un tampon permettant leur dénaturation. Puis, les protéines sont déposées sur un gel d'électrophorèse pour être séparées en fonction de leur poids moléculaire à l'aide d'un courant électrique. Ce gel d'électrophorèse contient du SDS, molécule anionique hautement chargée permettant de rendre toutes les protéines négatives afin que celles-ci ne migrent qu'en fonction de leur taille et non de leur charge. Ainsi, plus les protéines sont grosses, et moins elles migrent vite. Une fois la migration des protéines terminée, les protéines sont transférées sur une membrane ayant la propriété d'accrocher les protéines de façon non spécifique grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre les protéines et la membrane. La dernière étape correspond à la mise en évidence des protéines. Elle consiste à mettre la membrane en présence d'anticorps préalablement couplés à une enzyme. Ceux-ci se fixent alors sur les protéines et sont visualisés après une réaction enzymatique chimioluminescente. L'expression des protéines peut être quantifiée de manière semi-quantitative.

Protocole

Extraction des protéines

Après exposition cellulaire à 50 µg/ml de NP pendant 6h, les cellules ont été rincées 3 fois dans du PBS froid, puis lysées dans du tampon RIPA (Sigma-Aldrich) contenant 10 % d'anti protéases (Sigma Aldrich) et 1 % d'anti phosphatases (Sigma-Aldrich). Les lysats cellulaires sont alors centrifugés deux fois à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Les surnageants contenant les protéines sont alors récupérés et peuvent être conservés à -20°C.

Dosage des protéines

La quantité de protéines totales a été déterminée par la méthode de Bradford (Bio-rad, Etats-Unis). Cette méthode est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance, se manifestant par le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. La forme cationique (non liée) du colorant est rouge/marron tandis que la forme anionique (liée) du colorant est bleue et possède un spectre d'absorption maximal à 595 nm. Le changement d'absorbance du colorant étant proportionnel à la quantité de colorant lié, la mesure de l'absorption des lysats cellulaires détermine la quantité de protéines présentes dans l'échantillon, et cela à l'aide d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma Aldrich) d'une concentration de 0 à 80 µg/ml. La densité optique des échantillons et de la gamme a été mesurée à une longueur d'onde de 595 nm en utilisant un spectrophotomètre (Infinite® 200 Pro, Tecan). Une régression linéaire a été utilisée pour évaluer la concentration en protéines de chaque échantillon.

Préparation des échantillons et électrophorèse

Les échantillons, contenant 25 µg de protéines chacun, ont été incubés pendant 5 min à 95°C dans un tampon de charge Laemmli (0.125 M Tris HCl, 20% glycérol, 4% SDS, 10% β-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol) afin de dénaturer les protéines et de les charger négativement. Les échantillons ont alors été déposés sur un gel de polyacrylamide dont le pourcentage dépend de la taille des protéines que l'on souhaite séparer et visualiser (de 6% pour les plus grosses à 12,5% pour les plus petites). Sur chaque gel, un contrôle interne de l'expérience et un marqueur de poids moléculaire (Thermo Fisher Scientific) ont été déposés. L'électrophorèse s'est déroulée à température ambiante une heure à 60V puis 1h30 à 120V.

Transfert sur membrane

A la fin de la migration, les protéines ont été transférées du gel sur une membrane de polyfluorure de vinydilène (PVDF, Bio-rad) avec des pores de 0,2 μm (Bio-rad) à l'aide d'un courant électrique, afin de rendre les protéines accessibles à l'anticorps de détection. Les membranes de PVDF ont été activées avec du méthanol avant utilisation. Ces membranes lient toutes les protéines présentes dans le gel de manière non spécifique. Le transfert a été réalisé sur la nuit à 20V et à 4°C. Afin de vérifier le transfert complet des protéines, les membranes ont été colorées au rouge Ponceau (Bio-rad).

Saturation et incubation des membranes avec les anticorps

Les membranes ont ensuite été incubées dans une solution de lait écrémé 10% diluée dans du Tween Tris-buffered saline (TTBS, Tween 20 0,1 % et Tris-buffered saline) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation douce. Les protéines du lait se lient sur la membrane au niveau des sites non-occupés par les protéines. Ainsi, lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils ne peuvent s'attacher à la membrane que sur les sites de liaison de la protéine-cible, ce qui réduit le « bruit de fond », donne des résultats plus clairs et élimine les faux positifs. Après lavages au TTBS (3 fois 10 min), les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de lait écrémé 5% pendant une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Un récapitulatif des différents anticorps utilisés est présenté dans le Tableau 5. Les membranes ont ensuite été lavées au TTBS, afin d'éliminer tout anticorps primaire non lié à la membrane, puis elles ont ensuite été exposées à l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline pendant 1h à température ambiante dilué au 1/1000 dans une solution de lait écrémé 5%.

Détection par chimioluminescence

Après rinçages au TTBS de la membrane afin d'éliminer les anticorps secondaires qui ne se seraient pas liés aux primaires, la membrane est mise en présence du substrat de la peroxydase (ECL, Bio-rad) ou de la phosphatase alcaline (Bio-rad) à l'abri de la lumière. La détection et l'acquisition de l'image s'effectuent à l'aide d'une G-box (Syngene, Royaume-Uni).

Analyse

Afin de normaliser les expériences, une protéine, exprimée de façon constante dans les différentes conditions expérimentales, est choisie comme témoin de charge, ici, la β -actine. Ainsi, pour l'expression des résultats, l'intensité de la bande des protéines d'intérêt est rapportée à celle de la β -actine ou à la forme non phosphorylée de la protéine dans le cas de protéine phosphorylée.

Protéine	Fournisseur	Référence	Concentration utilisée	Hôte	Poids moléculaire
Atg5	Novus Biologicals	NB110-53818	1 µg/ml	lapin	56 kDa
β-actine	Sigma Aldrich	A5316	1/5000	souris	42 kDa
beclin 1	R&D systems	MAB5295	0,5 µg/ml	souris	60 kDa
Cathepsine B	R&D systems	AF965	0,1 µg/ml	chèvre	31 (forme mature) et 43 kDa (forme pro)
Cathepsine D	R&D systems	AF1029	0,1 µg/ml	chèvre	28 (forme mature), 45 kDa (forme prepro) et 50 kDa (forme pro)
LAMP1	R&D systems	AF4320	2 µg/ml	chèvre	120 kDa
LAMP2	Novus Biologicals	NB300-591	1 µg/ml	lapin	45 kDa
LC3	Novus Biologicals	NB100-2220	1 µg/ml	lapin	14 (LC3-II) et 16 kDa (LC3-I)
mTOR	Cell signaling	2972	1/1000	lapin	289 kDa
Phospho-mTOR (Ser 2448)	Cell signaling	2971	1/1000	lapin	289 kDa
p62	Progen Biotechnik	GP62	1/1000	cobaye	62 kDa
PTEN	Cell signaling	9552	1/1000	lapin	54 kDa
S6 Ribosomal Protein	Cell signaling	2317	1/1000	mouse	32 kDa
Phospho S6 Ribosomal Protein (Ser 235/236)	Cell signaling	2211S	1/1000	lapin	32 kDa

Tableau 5 : Anticorps utilisés en Western-Blot

3.2.6.2. ELISA

Principe

L'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) permet de détecter et quantifier la présence d'une protéine dans un échantillon biologique. Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique de détection permettant de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. La technique utilisée ici est celle dite « en sandwich » avec révélation indirecte par le système biotine-streptavidine. La première étape consiste à fixer sur le support un anticorps de capture. L'échantillon est ensuite ajouté et les antigènes présents dans cet échantillon et correspondant à l'anticorps de capture se lient à ce dernier. La troisième étape consiste à ajouter l'anticorps de détection biotinylé qui va se fixer à l'antigène. Enfin, la protéine streptavidine couplée à l'enzyme horseradish peroxydase (HRP) est ajoutée et interagit avec la biotine. L'ajout du substrat de l'enzyme (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine ou TMB) permet la conversion de ce dernier en un produit coloré, quantifiable par spectroscopie (Figure 19).

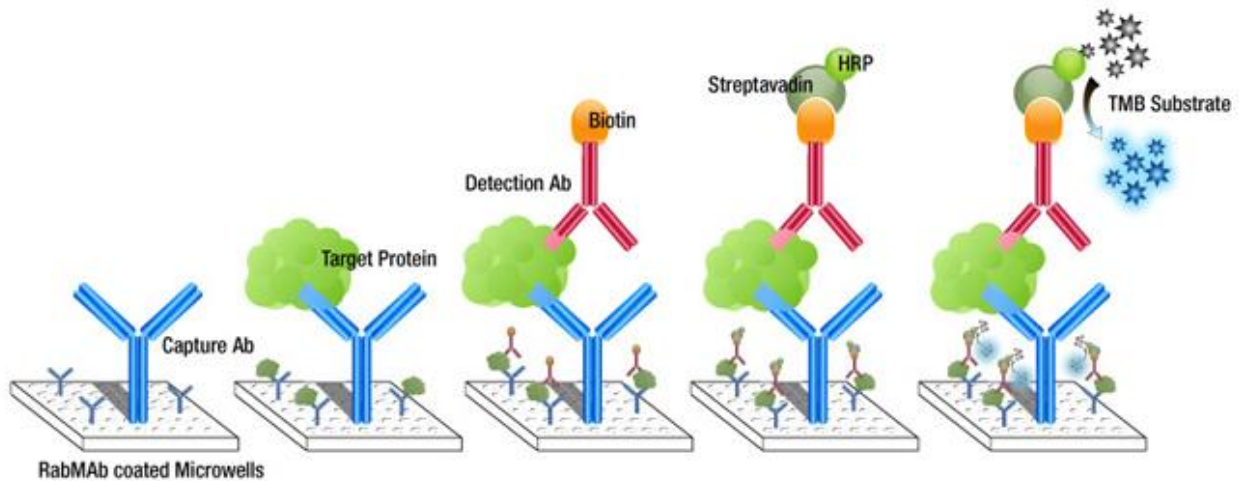


Figure 19 : Schéma d'un dosage ELISA "en sandwich"
(d'après Abcam®)

Protocole

Après exposition aux NP à une concentration de 50 µg/ml pendant 6h, les surnageants des cellules ont été récupérés, centrifugés pendant 10 min à 14000 rpm à 4°C afin d'éliminer les NP puis conservés à -80°C. La production de cytokines inflammatoires (IL-1β, TNF-α, MIP-2, MCP-1) dans les surnageants cellulaires a alors été dosée selon le protocole du fournisseur (R&D Systems, Etats-Unis). La lecture a été réalisée par un spectrophotomètre (Infinite® 200 Pro, Tecan) à une longueur d'onde de 450nm avec une correction à 540 nm.

3.2.7. Mesure du flux autophagique : utilisation de la sonde tandem mRFP-GFP-LC3

Principe

Ce test permet de mesurer le flux autophagique via la détection, par fluorescence, et la quantification des autophagosomes et autolysosomes dans des cellules transfectées. Pour cela, les cellules sontensemencées puis transfectées avec la sonde tandem RFP-GFP-LC3. Cette sonde doublement marquée avec la *red fluorescent protein* (RFP) et la *green fluorescent protein* (GFP), couplées à LC3, permet de détecter les structures autophagiques exprimant LC3. La protéine GFP étant sensible au pH, le signal de fluorescence verte s'éteint dans le lysosome, où le pH est acide. En revanche, la protéine RFP présente une fluorescence plus stable en milieu acide et peut donc être facilement détectée à l'intérieur des lysosomes. Ainsi, en exploitant la différence de stabilité de ces deux protéines fluorescentes, le flux autophagique dans les cellules peut être suivi par microscopie confocale à balayage laser. Les autophagosomes sont alors marqués en jaune (mRFP et GFP positifs) tandis que les autolysosomes sont marqués en rouge (seulement mRFP positifs). Si le flux autophagique est augmenté, une augmentation des autophagosomes et des autolysosomes est alors observée. Si le flux est bloqué, seul le nombre d'autophagosomes est augmenté, sans augmentation du nombre des autolysosomes.

Protocole

Transfection des cellules avec le plasmide mRFP-GFP-LC3

Les cellules ont été transfectées, avant l'exposition aux NP, avec la construction plasmidique bactérienne mRFP-GFP-LC3, fournie gracieusement par monsieur Patrice Codogno (U1151,

Paris). La transfection a été réalisée par électroporation, technique consistant à appliquer un champ électrique pour déstabiliser les membranes plasmiques des cellules afin que le plasmide rentre à l'intérieur de celles-ci. Cette transfection a été réalisée à l'aide de l'appareil *Nucleofector* (Lonza) et du kit spécifique *V Amaxa Cell line nucleofector for RAW 264.7* (Lonza) en suivant les recommandations du fournisseur.

Microscopie confocale à balayage laser

Après transfection puis exposition aux NP à 10 µg/ml pendant 6h, les cellules sont rincées trois fois au PBS puis fixées. Pour cela, les cellules ont été incubées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 20 min en chambre humide et à 4°C. Le montage entre lame et lamelle se fait avec du milieu de montage *Prolong Gold* contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Life Technologies), molécule fluorescente marquant les noyaux en se liant à l'ADN. L'observation des lames a été réalisée au microscope confocal à balayage laser LSM 510 Meta (Carl Zeiss). La quantification des autophagosomes (fluorescence jaune) et des autolysosomes (fluorescence rouge) a été réalisée sur au moins 50 cellules par condition.

3.2.8. Analyse de la structure du cytosquelette par immunofluorescence

Principe

L'immunofluorescence permet la détection et la localisation d'une ou plusieurs protéines cellulaires par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Les anticorps primaires se fixent sur leur antigène d'intérêt X. Des anticorps secondaires anti-immunoglobuline de l'anticorps primaire sont couplés à un fluorochrome et se fixent aux anticorps primaires. L'observation au microscope à fluorescence ou confocal permet de détecter la fluorescence émise par le fluorochrome suite à une excitation au laser, et ainsi, de localiser la protéine X.

Protocole

Après exposition aux NP à 10 µg/ml pendant 6h, les cellules ont été rincées trois fois au PBS puis fixées. Pour cela, les cellules ont été incubées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 20 min en chambre humide et à 4°C. Une fois rincées, les cellules ont été incubées 10 min en chambre humide à température ambiante avec du Triton X à 0,1%. Cette étape permet la

perméabilisation membranaire des cellules. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS puis incubées, toute la nuit à 4°C en chambre humide, avec l'anticorps primaire anti- α -tubuline (Life Technologies) dilué à une concentration de 25 μ g/ml dans du PBS avec 2% de BSA. Les cellules ont ensuite été incubées 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor 488, Life Technologies). Le montage entre lame et lamelle se fait avec du milieu de montage *Prolong Gold* contenant du DAPI (Life Technologies). L'observation des lames a été réalisée au microscope confocal à balayage laser LSM 510 Meta (Carl Zeiss). Le marquage de l'actine F a été réalisé directement en utilisant la phalloïdine (toxine ayant la propriété de se lier à l'actine) couplée à un fluorochrome Alexa Fluor 568 (Life Technologies) en incubant les cellules avec une unité par puits de phalloïdine pendant 20 min à température ambiante.

3.2.9. Dosage de l'activité des cathepsines

Principe

Cette méthode permet de mesurer l'activité des cathepsines, enzymes lysosomales, par fluorescence. Ce test est basé sur la capacité des cathepsines de l'échantillon à cliver les protéines au niveau de certains acides aminés. Une protéine substrat contenant un groupe 7-amino-4 methyl coumarin (AMC) fluorescent, mais dont la fluorescence est éteinte par la liaison formée entre son groupe amine et le groupe carboxyle du résidu arginine, est mise en présence de l'échantillon. Si les cathepsines de l'échantillon sont actives, cette liaison est coupée et ainsi, on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence.

Protocole

Après exposition cellulaire à 50 μ g/ml de NP, les cellules ont été rincées puis lysées dans un tampon de lyse à pH 5 (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,4 mM éthylène diamine tétra-acétique, 6 μ M aprotinine, NP40 0,5%). Les lysats cellulaires ont ensuite été centrifugés deux fois à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Les surnageants contenant les protéines ont alors été récupérés et conservés à -20°C. Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (décrite précédemment) et 6 μ g de ces protéines ont ensuite été incubés dans un tampon à pH 5 (0,1 M citrate, 4mM dithiothreitol, 4 mM éthylène diamine tétra-acétique acid, 0.02% Triton X-100) en présence de 10 μ M du substrat *Z-L-R-AMC Fluorogenic Peptide Substrate VII* (R&D systems) pendant 1h à 37°C. La lecture de la

fluorescence se fait immédiatement à l'aide d'un lecteur de plaque à fluorescence (Infinite® 200 Pro, Tecan) avec une longueur d'onde d'excitation à 380 nm et d'émission à 460 nm. Un inhibiteur de protéases, inhibant complètement l'activité des cathepsines, a été utilisé comme contrôle interne de l'expérience. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport aux cellules non traitées (condition contrôle).

3.3. Analyses statistiques

Chaque expérience a été réalisée au moins 3 fois de façon indépendante. Les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'écart-type sur la moyenne. Les données obtenues sur les cellules ayant reçu les différents traitements par les NP sont comparées aux témoins positif et négatif à l'aide d'un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi par un test de Mann-Whitney lorsqu'une différence était détectée, afin de comparer les différents groupes deux à deux. Le seuil de 5 % a été sélectionné pour considérer les résultats comme statistiquement significatifs. Le logiciel utilisé est GraphPadPrism5 (GraphPad Software, Etats-Unis).

CHAPITRE 4

4. Résultats

Les résultats concernant les effets de différentes NP sur l'autophagie dans un modèle cellulaire sont présentés dans la première partie de ce chapitre, sous forme d'un article intitulé « Carbon nanotubes and titanium dioxide nanoparticles differentially modulate the autophagy process; role of physico-chemical properties » soumis dans le journal « *Autophagy* ». Ce travail a porté sur l'étude de deux groupes de particules :

- Des particules sphériques : 1 NP de noir de carbone et 7 particules de TiO₂ qui diffèrent selon la taille, la structure cristalline, ou les propriétés de surface ; particules dont l'étude fait l'objet de cette thèse
- 4 nanotubes de carbones multi-parois (MWCNT) variant selon leur longueur et/ou leur chimie de surface (fonctionnalisation acide) et dont l'étude a fait l'objet d'une thèse précédente.

Le choix d'inclure les résultats concernant les MWCNT dans l'article portant sur mes travaux de thèse s'est naturellement imposé compte tenu du fait que ces deux travaux sont complémentaires. En effet, l'ajout de ce groupe de particules de forme tubulaire permet de mieux comprendre les effets des caractéristiques physico-chimiques des NP sur l'autophagie.

En deuxième partie de ce chapitre sont présentés des résultats complémentaires, portant principalement sur les effets des NP de dioxyde de titane et des CNT sur le stress oxydant et l'inflammation.

4.1. Résumé de l'article « Carbon nanotubes but not spherical nanoparticles block autophagy process by a shape-related targeting of lysosomes in murine macrophages »

Introduction

Les nanoparticules manufacturées, incluant les NP carbonées comme les CNT et les NP métalliques comme celles de TiO_2 , possèdent de nombreuses applications dans divers domaines ; elles sont en effet utilisées dans l'électronique, l'optique, la cosmétique, l'agroalimentaire, la médecine etc. L'accroissement de la production et l'utilisation grandissante de ces NP soulève la question de leur potentielle toxicité sur la santé humaine. De nombreuses études, réalisées sur des modèles cellulaires ou bien in vivo sur des modèles animaux ont démontré que les NP pouvaient être toxiques, entraînant par exemple des phénomènes de remodelage pulmonaire (fibrose et/ou développement de granulomes) après exposition par voie respiratoire. Cependant, ces effets ne sont pas toujours observés, et même si les caractéristiques physico-chimiques des NP sont décrites comme jouant un rôle prépondérant dans leur toxicité, les tenants et aboutissants exacts de la toxicité des NP ne sont pas encore clairement élucidés à ce jour. L'autophagie est un processus physiologique au cours duquel sont dégradés des composants cellulaires et/ou des organites, permettant entre autres de réguler l'homéostasie intracellulaire. Durant ce processus, une portion du cytoplasme est séquestrée dans une structure à double membrane appelée autophagosome. Cet autophagosome fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome à l'intérieur duquel le matériel cytoplasmique est dégradé. Il a été montré que l'autophagie pouvait jouer un rôle dans le développement et/ou la progression de certaines maladies (cancers, maladies neurodégénératives, maladies pulmonaires). L'implication de l'autophagie dans ces pathologies pourrait être liée à sa capacité à moduler les réponses oxydante et inflammatoire. Etant donné que les NP peuvent se retrouver dans les lysosomes, l'unité fonctionnelle de l'autophagie et étant donné que le stress oxydant et l'inflammation sous deux mécanismes principalement proposés comme sous-jacents aux effets toxiques des NP, une dysfonction de l'autophagie pourrait être un nouveau mécanisme pouvant expliquer, du moins en partie, la toxicité des NP. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets des NP sur l'autophagie, et de déterminer l'influence des caractéristiques physico-chimiques des NP sur ces effets.

Matériels et méthodes

Différentes NP présentant des caractéristiques physico-chimiques variées ont été utilisées dans cette étude : des NP carbonées (MWCNT ou noir de carbone) ou de TiO₂, différant selon leur forme (tube ou sphérique), leur longueur (CNT courts ou longs), leur taille (TiO₂ nanométrique ou micrométrique), leur structure cristalline (TiO₂ anatase et/ou rutile) ou leur propriétés de surface (CNT pristine ou fonctionnalisés, et NP d'or greffées à la surface de NP de TiO₂). In fine, 12 particules ont été utilisées : 4 MWCNT (court, court fonctionnalisé, long et long fonctionnalisé ; S-, SF-, L-, et LF-CNT respectivement), 1 NP de noir de carbone (FW2), 1 particule micrométrique de TiO₂ (Micro) and 6 NP de TiO₂ (A10, A/R, Rut, P25, P25-Au₃, P25-Au₆). Des macrophages murins (RAW264.7) ont été exposés à une concentration de 50 µg/ml de NP pendant 6 heures, et l'effet de ces NP sur les différentes étapes de l'autophagie a été évalué.

Résultats

Toutes les particules étudiées sont internalisées dans les macrophages, et induisent une accumulation d'autophagosomes. Les expériences de mesure du flux autophagique ont montré que les CNT bloquent l'autophagie tandis que les particules sphériques (FW2, Micro et les NP de TiO₂) induisent une autophagie fonctionnelle. L'étude des étapes précoces de l'autophagie (voies initiatrices de l'autophagie mTOR et beclin 1) montrent que l'accumulation d'autophagosomes induite par les particules sphériques ne dépend pas de l'activation de ces voies. De plus, nous avons montré que bien que l'étape de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes ne semble pas être atteinte par l'exposition aux MWCNT, l'exposition à ces particules induit une dysfonction lysosomale (augmentation du nombre du lysosome sans acidification).

Conclusions

Dans cette étude, nous avons montré que les nanomatériaux pouvaient moduler l'autophagie de façon différente selon la forme du nanomatériau : les NP en forme de tube bloquent l'autophagie (blocage potentiellement lié à une altération lysosomale) tandis que les particules sphériques induisent une autophagie fonctionnelle. Ces résultats apportent ainsi un nouvel

élément de réponse concernant les effets des NP sur l'autophagie et le rôle de leurs caractéristiques physico-chimiques sur ces effets.

4.2. Effets de différentes NP de TiO₂ et de nanotubes de carbone sur l'autophagie dans des macrophages murins

Carbon nanotubes but not spherical nanoparticles block autophagy process by a shape-related targeting of lysosomes in murine macrophages

Vanessa Cohignac^{1,2*}, Marion Julie Landry^{1,2*}, Audrey Ridoux¹, Mathieu Pinault³, Adèle Gerdil⁴, Nathalie Herlin⁴, Martine Mayne³, Masatake Haruta⁵, Patrice Codogno⁶, Jorge Boczkowski^{1,2,7}, Jean-Claude Pairon^{1,2,8} and Sophie Lanone^{1,2#}

¹Inserm, U955, Equipe 04, Créteil, France

²Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France

³CEA-DSM, IRAMIS, NIMBE-LFP (URA CEA CNRS 2453), Gif-sur-Yvette, France

⁴CEA-DSM, IRAMIS, SPAM-LFP (URA CEA CNRS 2453), Gif-sur-Yvette, France

⁵Department of Applied Chemistry, Graduate School of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan University, Japan

⁶Inserm, U1151, Institut Necker-Enfants Malade, Paris, France

⁷DHU A-TVB, Antenne de Pneumologie, Service de Réanimation Médicale Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil CEDEX, France

⁸Centre Hospitalier Intercommunal, Service de pneumologie et pathologie professionnelle, Créteil, France

* Equal contribution

Corresponding author:

Sophie Lanone

Inserm U955 Equipe 04

Faculté de Médecine de Créteil

8 rue du Général Sarrail

94000 Créteil

Phone: +33149813725

Fax: +33149813725

Email: sophie.lanone@inserm.fr

Keywords: Carbon nanotubes, Titanium dioxide, Autophagy, Lysosomes, Physico-chemical characteristics

Abbreviations: Atg5, autophagy-related gene 5; Atg12, autophagy-related gene 12; Au, gold; Baf A1, bafilomycin A1; CCVD, catalytic chemical vapor deposition; CNT, carbon nanotube; DLS, dynamic light scattering; EDX, energy dispersive X-ray; Fe_xO_y , iron oxide; GFP, green fluorescent protein; LAMP, lysosome-associated membrane protein; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3B; L-CNT, long carbon nanotube; LF-CNT, long functionalized carbon nanotube; mTORC1, the mechanistic target of rapamycin complex 1; MWCNT, multi-walled carbon nanotube; Noco, nocodazole; NP, nanoparticle; PTEN, phosphatase and tensin homolog; Rapa, rapamycin; RFP, red fluorescent protein; ROS, reactive oxygen species; S6RP, S6 ribosomal protein; S-CNT, short carbon nanotube; SF-CNT, short functionalized carbon nanotube; Stx17, syntaxin 17; SNAP29, synaptosomal-associated protein 29 kDa; SWCNT, single-walled carbon nanotube; TEM, transmission electron microscopy; TGA, thermogravimetric analysis; TiO_2 , titanium dioxide; VAMP8, vesicle-associated membrane protein 8; XRD, X-ray diffractometer

Abstract

It is now understood that manufactured nanoparticles (NP) can be toxic, depending on their physico-chemical characteristics. Although inflammation and oxidative stress are the most commonly described biological effects associated to NP exposure, the exact underlying mechanism(s) remain(s) to be fully elucidated. Autophagy, a physiological process that digests abnormal cytoplasmic components and organelles, could represent an interesting candidate. The overall aim of this work was therefore to characterize in depth the effects on autophagy of macrophage exposure to NP, with a particular attention to the role of NP physico-chemical characteristics. Twelve particles differing in chemical composition, shape, size, length, crystal phase, and/or surface properties were used: 4 multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), 1 carbon black NP (FW2), 1 micrometric TiO₂ (Micro) and 6 TiO₂ NP. An extensive characterization of each particle was performed, and their effect on the autophagy pathway of RAW 264.7 murine macrophages thoroughly analyzed; from initiation steps (autophagosome formation and accumulation), to autophagosome fusion with lysosome, and further degradation as autolysosomes. We demonstrate that exposure to all particles lead to the accumulation of autophagosomes, related to the blockage of the autophagic flux for MWCNT or a functional autophagy for spherical NP. Moreover, we provide evidence that lysosomal dysfunction is the molecular mechanism underlying autophagy blockade by CNT. These results isolate for the first time the shape as a main determinant of the interaction of NP with the autophagy pathway. Identifying the lysosomes as primary targets of MWCNT toxicity open new ways in the interpretation and understanding of nanomaterials toxicity.

Background

Engineered nanomaterials, including carbon nanotubes (CNT) and metal nanoparticles (NP), have already widespread applications in various industrial fields; they are utilized in electronics, optics, cosmetics, food products, drug delivery etc... Because engineered nanomaterials became part of our everyday life, there has been an increasing concern regarding the health consequences that could result from human exposure to these nanomaterials. A large body of studies, performed *in vitro* in cells or *in vivo* in laboratory animals has now been published showing evidences that engineered nanomaterials can exert harmful effects^{1, 2}, with the generation of an oxidative stress and the development of an inflammatory response as the most commonly accepted underlying mechanisms. For example at the respiratory level, which is considered as a major exposure route, some CNT or titanium dioxide (TiO₂) NP have been shown to induce lung remodeling, consistent with fibrosis and/or the development of granulomas.^{3, 4} However, these effects are not always described, and, if the physico-chemical characteristics of the nanomaterials are often proposed as important determinants of their toxic effects, the exact ins and outs of nanomaterials toxicity are not completely understood yet.^{5, 6}

Autophagy is a physiological process aimed to maintain cellular homeostasis, in which cytoplasmic components are digested via a lysosomal pathway. During this process, a portion of cytoplasm is engulfed by a double membrane structure called autophagosome, which subsequently fuses with a lysosome, leading to the formation of an autolysosome, where the degradation of the enclosed materials by lysosomal enzymes can occur.⁷ Autophagy has been shown to play a key role in various pathological processes, such as cancer, or cardiovascular and pulmonary diseases.⁸ The involvement of autophagy in these diseases could be linked to its role in the down-regulation of oxidative stress and inflammatory responses.⁹ Since NP could end up in lysosomes, the functional organelle of autophagy, and given that oxidative stress and inflammatory responses are two major mechanisms underlying NP toxicity, a dysfunction of the autophagy process could represent a new mechanism explaining, at least in part, NP toxicity.¹⁰

A few studies have been published so far regarding the effects of cellular exposure to NP on the autophagy process. From these studies, it is currently not clear whether these nanomaterials (metal oxide NP such as TiO₂, Fe_xO_y, ... or carbonaceous ones such as graphene or CNT) induce or block autophagy.^{11, 12} Surprisingly, almost none of them has been performed in macrophages, although this cell type is particularly relevant to the interaction

with NP and their processing.¹³ Moreover, although the physico-chemical characteristics of nanomaterials are known to be important determinants of their toxicity, only a few studies did address this issue on the autophagy process. For example, Yu *et al* have shown that pristine multi-walled CNT (MWCNT), but not acid-functionalized ones induced an abnormal accumulation of autophagosomes, probably because of an autophagy blockade.¹⁴ Moreover, it has been shown that TiO₂ NP could induce an increase of the autophagic flux, not observed with iron or zinc NP of similar size, suggesting that the chemical nature of NP could differently impact the autophagy process.¹² However, the specific relevance of each of physico-chemical characteristics of NP on their effect on autophagy is far from understood and deserves more systematic investigations.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of macrophage exposure to NP on autophagy, with a particular attention to the role of NP physico-chemical characteristics in this process. For this purpose, RAW 264.7 murine macrophages were exposed to carbonaceous (MWCNT or Carbon black) or metal oxide (TiO₂) NP, varying in shape (tube or spherical), length (short or long CNT), size (nano or micro TiO₂), crystal phase (anatase and/or rutile TiO₂), or surface properties (pristine or acid-functionalized CNT, and Au grafting on TiO₂ NP). Overall, the effects of 12 nanomaterials were investigated: 4 MWCNT (short, short functionalized, long and long functionalized; S-, SF-, L-, and LF-CNT respectively), 1 carbon black NP (FW2), 1 micrometric TiO₂ (Micro) and 6 TiO₂ NP (A10, A/R, Rut, P25, P25-Au3, P25-Au6). The effects of such exposure on the autophagy process were thoroughly characterized thanks to an in-depth analysis throughout the whole process; initiation of autophagy with autophagosome formation and accumulation, fusion with lysosome, and further degradation as autolysosomes.

Results

Characterization of particles

Typical transmission electron microscopy (TEM) images of the different nanomaterials are presented in Figure 1A. The 4 MWCNT present the typical tubular morphology of nanotubes, and all TiO₂ particles are spherical except the rutile one (Rut), which is needle-like (Figure 1A). As expected, the 4 MWCNT present a similar diameter (Figure 1B), and a shorter length for S- and SF-CNT as compared to L- and LF-CNT (Figure 1C and Table 1). Moreover, the size distribution for S- and SF-CNT on one hand, and L- and LF-CNT on the other hand, is similar (Figure 1C), indicating no influence of acidic functionalization on this parameter. The physico-chemical characteristics of the different particles are summarized in Table 1. The crystal phase of TiO₂ particles was assessed by X-ray diffraction analysis: in accordance with the manufacturers' data, A10 and Micro are 100% anatase, Rut is 100 % rutile and A/R and P25-based NP are a mix of anatase and rutile (with an anatase:rutile ratio of 13:7 and 4:1 respectively). Particle morphology and chemical composition were confirmed using scanning electron microscopy coupled to an energy dispersive X-Ray (EDX) analysis (data not shown). Thermogravimetric analysis (TGA) shows that the average iron content is roughly similar for non-functionalized CNT (4.4 and 4.5 wt% for S- and L-CNT respectively), and for the functionalized ones (1.3 and 1.0 wt% for SF- and LF-CNT respectively). All particles, except micrometric TiO₂ (Micro), present a surface area over 20 m²/g. For all particle suspensions, except for the rutile one, the zeta potential is lower than |25| mV, a commonly admitted limit above which the suspension is stable, indicating that the suspensions could be agglomerated. This is confirmed by the measurement of hydrodynamic diameter, with values between 54 and 1033 nm. Endotoxin levels are below the detection limit for all particles. S-, L- and LF-CNT are the most potent particles to generate ROS in acellular conditions, whereas SF-CNT, FW2 and Rut do not produce any detectable ROS.

All particles are internalized by macrophages *in vitro*

Figure 2 shows representative TEM images of macrophages exposed for 6 hours to the different particles or to rapamycin, a positive control of autophagy induction. As expected, autophagic vacuoles are detectable in rapamycin-treated cells. All particles are internalized by macrophages. Visible aggregates of particles are present mainly inside autophagic vacuoles, except for TiO₂ Micro particles that are mainly found inside vacuoles presenting no cellular component. No particle is found in the nucleus or mitochondria of the treated cells. In addition, mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus do not show any obvious

sign of morphological alteration, overall suggesting an absence of NP-induced toxicity. This is confirmed by the absence of modification in mitochondrial activity or DNA content, whatever the treatment of the cells up to 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figure S1A and S1B). Therefore, we choose to expose cells to 50 $\mu\text{g/ml}$ of particles, taken as a non-cytotoxic dose.

Exposure to TiO_2 NP induces, whereas exposure to MWCNT inhibits autophagy

To elucidate the effect of MWCNT and TiO_2 NP on the autophagic process, we first examined the accumulation of autophagosomes in macrophages exposed to the different particles for 6 hours, by the quantification of LC3-II protein expression. As shown in Figure 3A and 3B, all particles induce a significant increase of LC3-II protein expression in macrophages. Enhanced LC3-II levels could be the result of either an increased autophagosome synthesis (induction of autophagy) or of a decreased autophagosome turnover (blockade of autophagy flux). To distinguish between these two opposite scenarios, we investigated the amount of p62 protein, a substrate protein for autophagy that is normally degraded if the autophagy flux is intact.¹⁵ As shown in Figure 3A & 3C, and as expected, rapamycin treatment significantly decreases the level of p62 protein. Conversely, p62 expression was significantly increased in all particle-treated groups as compared to control condition. As shown in Figure S2, no significant increase in p62 mRNA expression was detected, except after exposure of RAW macrophages to P25 NP, which suggests that the accumulation of p62 results from an absence of degradation of the protein.

Because p62 can interact with several proteins involved in signaling pathways other than autophagy, we wanted to confirm that the increased p62 expression detected in response to all particles indicated a blockade of autophagy flux. For that matter, we assessed the expression of LC3-II in the presence of autophagy inhibitors. Using bafilomycin A1, a specific vacuolar H^+ -ATPase type inhibitor, we show that MWCNT-induced accumulation of LC3-II is not enhanced in presence of the inhibitor, suggesting that exposure to MWCNT already inhibited autophagy. Conversely, the accumulation of LC3-II initially observed in response to the others particles (FW2, Micro and TiO_2 NP) is upregulated in the presence of bafilomycin (Figure 3D and E). This suggests that these particles are able to induce autophagy. Similar results are obtained in presence of a different autophagy inhibitor; chloroquine (data not shown).

In order to definitively conclude on the effects of particle exposure on the autophagy flux, we used the GFP-mRFP-LC3 plasmid transfection in macrophages. This probe is used to identify

and differentiate autophagosomes (GFP+ and RFP+, seen as yellow dots) from autolysosomes (GFP- and RFP+, seen as red dots) thanks to the quenching of GFP fluorescence in acidic compartments. Confocal images of rapamycin-treated macrophages, but also of cells exposed to FW2, Micro and TiO₂ NP, show an increase of total autophagic structures together with an increase of autolysosome number as compared to what is found in unexposed cells, consistent with the induction of autophagy (Figure 4). Conversely, exposure to MWCNT is associated with a bafilomycin-like phenotype, with an increase of the total autophagic structures in absence of an increase of autolysosome number. This suggests a lack of acidic compartment and confirms the blockage of the autophagic flux in response to these NP. Overall, these results suggest that exposure to TiO₂ NP induces, whereas exposure to MWCNT inhibits autophagy.

Autophagosome accumulation in response to spherical particles does not depend on the activation of initial steps of autophagy

The activation of initial steps of autophagy is under the control of several molecular complexes, among which are class III PI3K/beclin1 and class I PI3K/mTORC1 complexes.⁷ To determine whether these complexes are involved in particle-induced autophagosome accumulation, we investigated the expression level of beclin1, that of the Atg5-Atg12 complex, which is essential to the autophagosome formation, as well as the expression level of phospho-S6RP, an mTORC1 downstream protein attesting of its activity. As shown in Figure 5A, 5B and 5C, neither beclin1 nor Atg5-Atg12 expression levels are modified after exposure to the different particles. Surprisingly, although no modification of the expression of class I PI3K negative regulator PTEN is observed, the phosphorylation of S6RP is significantly increased in response to MWCNT, indicating an activation of mTORC1 (Figure 5A, D and E). This suggests that, although exposure to MWCNT induces the overall accumulation of autophagosomes, MWCNT block the autophagy process in its initial steps. On the other hand, the accumulation of autophagosomes observed in response to spherical NP can not be attributed to an activation of the initial steps of autophagy.

The fusion machinery between autophagosomes and lysosomes is not impaired by particles

An impairment of the fusion between autophagosomes and lysosomes could explain the perturbations in the autophagy process observed after exposure to MWCNT in particular.¹⁰ Since, the cytoskeleton (particularly the microtubule network, and to a lesser extent, the actin

one) is crucial to the fusion of autophagosome with lysosome, we next examined the cytoskeleton structure by α -tubulin immunostaining. As expected, Figure 6 shows the disruption of the microtubule network when cells are treated with nocodazole, an inhibitor of the microtubule polymerization. However, no disruption of the microtubule network is observed after exposure of RAW macrophages to particles, regardless of the nature of the particle used. Moreover, we also observe no change in the actin cytoskeleton (data not shown). Furthermore, the overall gene expression of several SNARE proteins (Stx17, SNAP-29, and VAMP8) that mediate autophagosome-lysosome fusion,¹⁶ is not modified by any exposure to particles (data not shown). These experiments strongly suggest that the decreased autolysosome number, and thus the perturbation of autophagy flux after MWCNT exposure, is not related to an impairment of the fusion machinery between autophagosomes and lysosomes.

Exposure to MWCNT induces lysosomal accumulation

Having demonstrated that the cytoskeleton, necessary to the fusion between autophagosomes and lysosomes is not altered by particle exposure, we next investigated lysosomes as potential targets of MWCNT. The protein expression of LAMP1, LAMP2 and mature Cathepsin D, but not that of mature Cathepsin B is increased after exposure to MWCNT as compared to unexposed cells (Figure 7), suggesting an increase in lysosome number. No difference with the control condition is observed after exposure to the other particles, whatever the protein studied. Given the lack of acidic compartments detected earlier (Figure 4), these results overall demonstrate that MWCNT induce an alteration of lysosomal function.

Discussion

In our study, we used 12 different nanomaterials presenting various physico-chemical characteristics (chemical composition, shape, length, size, crystal phase, surface properties) to evaluate their effects on autophagy in macrophages. Overall, our results show that the nanomaterials we examined can either activate or block autophagy, and identify for the first time the shape as a main determinant of these effects. Moreover, we provide the first evidence that lysosomal dysfunction is the molecular mechanism underlying autophagy blockade by CNT.

We could observe the accumulation of autophagosomes after macrophage exposure to whatever nanomaterial. Such findings are in accordance with the literature, which describes a similar accumulation in response to CNT, TiO₂ and other nanomaterials, in various cell types.¹⁰ The activation of the initial steps of autophagy could be a mechanism underlying the accumulation of autophagosomes. Several protein complexes regulate autophagy initiation and phagophore formation: the mTORC1 complex that negatively regulates autophagy, the class III PI3K/beclin1 complex and two ubiquitin like conjugation systems, composed of Atg proteins. We did not detect any activation of the initial steps of autophagy mediated by an inhibition of mTORC1 in response to spherical NP. These results are interesting given that, until now, the few studies published on the subject described a contribution of mTORC1 in the cellular response to nanomaterial exposure. Indeed, Liu and colleagues reported an increased formation of autophagosomes dependent on the inhibition of the mTOR/Akt pathway, in A549 pulmonary epithelial cells exposed to carboxylated SWCNT.¹⁷ Moreover, several studies showed that NP-induced autophagy was related to the inhibition of mTOR/Akt pathway and/or the involvement of beclin1 complex.¹⁸⁻²¹ Although other partners of mTOR/Akt and class III PI3K/beclin1 pathways have not been investigated here, our results suggest that the accumulation of autophagosomes in response to spherical NP is independent of the canonical mTOR and beclin1 complexes regulating autophagy. Indeed, alternatively to the canonical pathway where autophagosomes are formed by the hierarchical recruitment and activity of Atg proteins, the formation of autophagosomes can also be activated by bypassing pathways. Several non-canonical autophagy alternatives have been identified at each autophagosome formation steps: one that bypasses the proteins that are important for initiation (such as mTORC1 and ULK1) or important for nucleation (such as beclin1), and others that bypass the proteins involved in the phagophore elongation and closure (Atg7, Atg5 and LC3).²² The implication of this potential non-classical autophagy pathway(s) in response

to nanomaterials should deserve further studies. Moreover, and although exposure to MWCNT induced an overall accumulation of autophagosomes, we surprisingly observed an activation of the mTORC1 pathway. This could be related to the inhibition of lysosomal function that we observed in response to MWCNT. Indeed, it has been recently published that the pharmacological inhibition of lysosomes activates the mTORC1 signaling pathway in an autophagy-independent manner.²³

Several mechanisms could explain the specific accumulation of autophagosomes observed in response to MWCNT exposure: 1/ an impaired trafficking of autophagosomes to the lysosomes, 2/ an impaired machinery for the fusion between autophagosomes and lysosomes and/or 3/ a defective lysosomal activity. Indeed, previous studies have shown that nanomaterials can disrupt the cytoskeleton network, leading to subsequent toxicity.²⁴ For example, a carbon-based nanomaterial (fullerenol) was shown to induce the disruption of actin filaments in a porcine renal proximal cell line, leading to the accumulation of autophagosomes.²⁵ In our study, the analysis of the cytoskeleton structure shows that the cytoskeleton network was not modified whatever the nanomaterial, suggesting that the trafficking of autophagosomes to lysosomes could occur correctly. Together with our results on SNARE proteins, this suggests that the necessary machinery for the fusion between autophagosomes and lysosomes is present. Finally, as lysosomal integrity is important to lysosomes fusion with autophagosomes, the accumulation of autophagosomes could be related to the alteration of lysosomal function that we detected after exposure to MWCNT. This alteration could be linked to a direct interaction of lysosomes with CNT as recently demonstrated by our team.²⁶ Overall, the potential mechanism of action underlying MWCNT effect on autophagy could be the alteration of lysosome function; although the fusion machinery between autophagosomes and lysosomes appears intact, lysosomes accumulate because they can't fuse with autophagosomes, leading to the accumulation of autophagosomes, and the subsequent decreased formation of autolysosomes (Figure 8).

The measurement of autophagy flux is considered as the best end-point to evaluate autophagy process.¹⁵ We addressed this issue with several additional methods; LC3-II quantification in presence of bafilomycin or chloroquin, quantification of autophagosomes and autolysosomes by GFP-mRFP-LC3 plasmid, and quantification of p62 protein expression, as a substrate of autophagy. Overall, these experiments suggested a blockade of the autophagy flux by MWCNT, and an enhancement of the flux in response to the other particles. It's important to note however that p62 protein levels were enhanced after macrophage exposure to all

nanomaterials, which could appear in disagreement with our conclusion regarding the activation of a functional autophagy by all particles but MWCNT. Indeed p62 is a ubiquitin-binding scaffold protein which binds directly to LC3 and thus acts as a selective autophagy substrate and cargo receptor for the degradation of ubiquitinated targets by autophagy.¹⁵ However, accumulating data from the literature suggest that autophagy degradation could also be independent of p62²⁷⁻³⁰, as p62 presents several domains that can interact with various signaling molecules.¹⁵ Finally, p62 participates in proteasomal degradation and its level may also increase when the proteasome is inhibited.³¹ Overall, the exact significance of p62 accumulation in our study will deserve further investigations.

Our work was dedicated to evaluate the role of nanomaterials physico-chemical characteristics in their effects on autophagy. In light of our results, the shape (tubular for CNT versus spherical for the other nanomaterials) seems to be the most important characteristic to overall induce or block autophagy. It is difficult to compare our results with those of the literature, as, to the best of our knowledge, no study so far has compared nanomaterials presenting different shapes. The only experimental work performed on CNT demonstrated that pristine but not acid-functionalized MWCNT "block" the autophagy flux¹⁴ as opposed to our study where surface or length modifications of CNT didn't have any impact. However, it is important to note that Yu and colleagues only evaluated LC3-II and p62 staining in mice lungs, which is far from sufficient to draw a definitive conclusion on autophagy flux modulation.¹⁵ The effects of TiO₂ NP on autophagy have been more often studied in the literature. These NP were shown to induce a functional autophagy in human colon adenocarcinoma and glioblastoma cells in vitro.¹² Interestingly, these authors did not observed an induction of autophagy in response to zinc or iron oxides NP, indicating a possible effect of chemical composition on autophagy. Our study didn't evidence any effect of surface modifications on autophagy modulation, as neither CNT functionalization nor Au grafting on TiO₂ NP induced differential effects on autophagy modulation. Interestingly, Rutile NP, which present a needle-like shape, did not behave like CNT in regards to autophagy. This could be related to their different chemical composition. However, when used as spherical NP, carbon (FW2) and TiO₂ NP have similar effects. More probably, the specific effect of CNT as opposed to Rutile NP is the result of very different diameter to length ratio between them: 1:4 for Rutile NP, and 1:30 or 1:65 for S/SF- or L/LF-CNT, respectively. Indeed, this parameter can highly affect the particle-cell interactions, and could be particularly important in our experimental setting.³² The effect of CNT could be related to a destabilization of the lysosomal membrane as described by Sohaebuddin and collaborators in 3T3 fibroblasts

exposed to MWCNT presenting a diameter of less than 8 nm.³¹ Moreover, SWCNT was demonstrated to behave as K⁺ ion channel blockers, potentially via a direct interaction between CNT and the ion channel.^{32, 33} We could imagine a similar interaction of MWCNT with H⁺-ATPase that could help understand the results obtained in our study. However, the exact nature of these interactions still remains to be elucidated.

Conclusion

Our study demonstrates that macrophage exposure to MWCNT block autophagy via the alteration of lysosomal function, while spherical nanomaterials induce the activation of a functional autophagy. Identifying the lysosomes as primary targets of MWCNT toxicity open new ways in the interpretation and understanding of nanomaterials toxicity.

Materials and methods

Production of particles

Twelve particles, presenting various physico-chemicals properties were investigated: 4 MWCNT, one carbon black NP, one micrometric sized TiO₂ particle and 6 TiO₂ NP.

The MWCNT were synthesized by the following method. The initial aligned multi-walled CNT powder (at the gram scale) was produced by aerosol-assisted catalytic chemical vapor deposition (CCVD).³⁴ This method is based on the catalytic decomposition of liquid hydrocarbons by injecting mixed aerosols containing both the hydrocarbon and the metallic sources which simultaneously and continuously fill the reactor. A solution composed of ferrocene dissolved in toluene (1.25 wt. %) was used to synthesize the nanotube samples at 800 C under Ar/H₂ atmosphere (70 %/30 %). The duration of the growth was set at 45 minutes. The presence of dihydrogen in the vector of the aerosol allowed to obtain a small external diameter, as previously described by Celia Castro et al.³⁴ Following this procedure, the sample was formed of aligned CNT carpets covering the reactor walls. Once detached from the reactor walls by scrapping, the precursor sample was treated in de-ionized water (Millipore, 18.2 M .cm), with a dispersing agent (1% biliary salts, composed of 50 % sodium deoxycholate (≥ 98 %) and 50 % sodium cholate (99 %), Acros Organics). An ultrasonic probe Bioblock Vibracell 75043 working at 20 kHz and 375 W in pulse mode (1s/1s amplitude, 50% power) was used to control the CNT shortening and reach a desired length distribution.³⁵ Different ultrasonic treatment durations were applied to obtain two distinct groups of CNT: a short group and a long group, after respectively 7 hours and 5 minutes of ultrasounds. Both CNT powders were purified at 1000 C under Ar atmosphere after filtration in order to remove/burn traces of dispersing reagent. The two dry samples were then separated in two sub-groups. One sub-group of each group was treated by acidic solution (75% H₂SO₄ and 25% HNO₃) at 60 C for 2 hours in order to functionalize the nanotubes by grafting oxidized groups on their surface. Finally the different sub-groups were extensively washed with de-ionized water, and final dry samples of CNT were obtained by evaporating water in a fume hood. Ultimately, four distinct groups were obtained, with controlled length and surface chemistry: short (S-CNT), short functionalized (SF-CNT), long (L-CNT) and long functionalized (LF-CNT).

The others particles were purchased from different suppliers: A10 (TiO₂) and Rut (TiO₂) were obtained from Nanostructured & Amorphous Materials (Houston, TX); A/R (TiO₂) was supplied by Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO); P25 (TiO₂) and FW2 (CB) were supplied by

Evonik Industries (Essen, Germany); and Micro (TiO₂) was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). P25 - Au3 (P25 with 1% of Au NPs of 3 nm of diameter grafted on its surface) and P25 - Au6 (P25 with 1% of Au NPs of 6 nm of diameter grafted on its surface) were kindly provided by Professor Matasake Haruta (Tokyo Metropolitan University, Japan).³⁶

Physicochemical characterization of the particles

The size, size distribution and zeta potential of the particles suspended in water were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) using a ZetaSizer HS 3000 (Malvern Instrument, Worcestershire, United Kingdom). Particle size and shape were also characterized by transmission electron microscopy (TEM) using Philips CM12 instrument (Amsterdam, Netherlands) at an accelerating voltage of 80 kV. Particle morphology and composition were confirmed using a scanning electron microscopy (SEM) (Carl Zeiss Ultra 55, Oberkochen, Germany) coupled to an energy-dispersive X-ray system (EDX) (Bruker, Billerica, MA). For TiO₂ particles, crystallinity was determined using a X-ray diffractometer (XRD) (Siemens D5000, Munich, Germany). The measurement of the specific surface area of the particles was carried out by a Micromeritics Flowsorb 2300 (Norcross, GA) using the Brunauer Emmett Teller (BET) analysis. For the MWCNT, thermogravimetric analysis (TGA) was performed with a TGA 92–16, 18 Setaram apparatus (Setaram Instrumentation, France) under flowing air at a temperature up to 1000°C (10°C/minute heating ramp) to determine the sample initial iron content by measuring the remaining iron oxide weight.

Particles were assessed for endotoxin contamination using the Limulus Amebocyte Lysate assay (Lonza, Bâle, Switzerland), performed as recommended by the manufacturer.

The intrinsic production of ROS by particles was measured in acellular conditions using the properties of ϕ X174 RFI plasmid DNA (Thermo Fisher Scientific). This DNA has the ability to decoil in presence of ROS. 290 ng of plasmid DNA were mixed with 100 μ g/mL of particles for 8 hours at 37°C.³⁷ The PstI endonuclease (Thermo Fisher Scientific) was used as a positive control. The different forms of DNA in the samples (coiled, decoiled and linearized) were then separated on an agarose gel (0.8%) for 16 hours at 30 mV. The intensity of the different DNA bands was quantified, and the ratio of the decoiled and linearized DNA intensity to the total DNA intensity was calculated.

Particles suspensions preparation

Stock suspensions of particles (2 mg/ml) were prepared in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life Technologies, Carlsbad, CA) and stored at -20°C until use. Stock suspensions were diluted in DMEM supplemented with 1% of antibiotics (penicillin-streptomycin, Life Technologies) without fetal bovine serum (FBS) and sonicated for 15 minutes just before cell exposure.

Cell culture

A murine macrophage cell line, RAW264.7 was used in this study (ATCC, Manassas, VA). Cells were grown in DMEM cell culture medium supplemented with 10% of FBS and 1% of antibiotics (penicillin-streptomycin). Cells were cultured on plastic material and were maintained at 37°C temperature in humidified atmosphere containing 5% CO₂. Sub-confluent cell cultures were exposed for 6h to 10-100 µg/ml of particles in DMEM in absence of FBS. For some experiments, cells were treated with bafilomycin A1 (Baf A1, 100 nM, Sigma Aldrich), chloroquine (CQ, 100 µM, Sigma Aldrich) during 2 h before the end of particle exposure or with rapamycin (Rapa, 100 nM, Sigma Aldrich) during the duration of the experiment. All experiments were performed using cells between passages 4 and 15.

Cell viability assay

Two methods were used to evaluate changes in cell viability: the mitochondrial activity assay (WST-1 assay, Roche Diagnostics, Switzerland) and the quantification of DNA content (Hoechst assay, Sigma-Aldrich). For each method, cells were seeded on 96-well plates and left to settle during 24h. Cells were then exposed to a scaling dose of particles (10-100 µg/ml) during 6h. Exposure to 10% triton X-100 was used as positive control (Sigma-Aldrich). These tests were performed following the manufacturer's instructions. The cell viability was expressed as a percentage of the viability of the control cells.

Ultra-structural analysis

Internalization of particles and morphology of cells were studied using TEM. After 6h treatment with 50 µg/ml of particles, cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 0,1M sodium cacodylate buffer pH 7.4, post-fixed in 1% osmium and embedded in Epon. Ultrafine sections (90 nm thick) were collected on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate and observed using a JEOL 1400 transmission electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

Real time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total mRNA was isolated from exposed cells (50 µg/ml of particles during 6h) using the RNeasy kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Reverse transcription reactions were performed with Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The expression of autophagy genes was determined by RT-PCR using the Sybr Select Master Mix (Life Technologies) in a QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Life technologies). Expression of mRNA was normalized to that of AIP and SF3A1 as a housekeeping genes. Primers were purchased from Qiagen.

Western Blot

Protein expression was evaluated on cell lysates obtained after exposure of macrophages to 50 µg/mL of particles for 6 hours. Cell lysates were prepared by extracting proteins with RIPA lysis buffer (Sigma Aldrich) supplemented with protease inhibitors. Twenty five µg of protein were separated via SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline, and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The primary antibodies used in this study were: Atg5, LAMP2, LC3 (Novus Biologicals, Littleton, CO), Beclin1, Cathepsine B, Cathepsine D, LAMP1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), p62 (Progen Biotechnik, Germany), mTOR, phospho-mTOR (Ser 2448), PTEN, S6 Ribosomal Protein, phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser 235/236) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), β-actin (Sigma Aldrich). β-actin was used as an internal standard. Quantification of the expression of each protein was obtained using the ratio to β-actin expression, and normalized to the ratio obtained in control conditions.

Confocal scanning immunofluorescence microscopy

Cells were exposed to 10 µg/ml of particles during 6 hours and then fixed with freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA) at 4°C for 20 minutes. The cells were then permeabilized with Triton X-100 (0,1% solution diluted in PBS) during 10 min. For cytoskeleton structure analysis, cells were incubated with the anti-α-tubulin primary antibody overnight at 4°C (Life Technologies) followed by an incubation of 1h with an Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (green, Life Technologies). For actin staining, cells were directly incubated with an Alexa Fluor 568 phalloïdin (red, Life Technologies) for 20 min. The slides

were mounted with a coverslip using Prolong Gold mounting medium with DAPI (Life Technologies). Cell images were obtained using an LSM 510 META confocal microscope (Carl Zeiss).

mRFP-GFP-LC3 assay

To monitor autophagy flux, RAW 264.7 macrophages were transfected with mRFP-GFP-LC3 plasmid by nucleofection, using an Amaxa cell line nucleofector kit V for RAW 264.7 (Lonza) and following the manufacturer's instructions.

The following day, transfected cells were treated with 10 µg/ml of particles for 6h. After treatment, the cells were fixed with 4% PFA in phosphate-buffered saline (PBS), and imaged using LSM 510 META confocal microscope (Carl Zeiss). Autophagy was measured by counting the cells presenting GFP-LC3 puncta or GFP+/mRFP+ (yellow i.e. autophagosomes) and GFP-/RFP-LC3+ (red i.e. autolysosomes) puncta. At least 30 cells/sample were counted for each condition.

Statistical analysis

Each value is given as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of at least 3 experiments. Data were analyzed with the commercially available software GraphPad (GraphPad Prism 5.01, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). Comparisons between multiple groups were performed using Kruskal–Wallis' non-parametric analysis of variance test followed, when a difference was detected, by two-by-two comparisons with the Mann–Whitney's t test. P-values <0.05 were considered significant.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest

Authors' contributions

VC and MJL performed the experimental work, analyze data and equally wrote the first draft of the manuscript. AR helped in the experimental work. AG, MP, MM, MH and NH performed the particle synthesis and/or characterization. JB, JCP and SL critically reviewed the manuscript and worked on its final elaboration. All the authors have read and approved final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the “Agence Nationale de la Recherche France” (Nanautophagie ANR-13-CESA-0010-01). The authors would like to acknowledge the support they obtained from DHU A-TVB (Département Hospital-Universitaire Ageing-Thorax Vessel Blood) and from the Labex SERENADE (11-LABX-0064). VC is supported by a fellowship from C’Nano Ile-de-France. C’Nano-IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by the National Center for Scientific Research (CNRS), the Atomic Energy Commission (CEA), Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), and the Région Ile-de-France. MJL is supported by a fellowship from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus which is supported by the Conseil Général de l’Essonne.

References

1. Boczkowski J, Lanone S. Respiratory toxicities of nanomaterials -- a focus on carbon nanotubes. *Advanced drug delivery reviews* 2012; 64:1694-9.
2. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10:15.
3. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207:221-31.
4. Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology* 2009; 260:37-46.
5. Lanone S, Andujar P, Kermanizadeh A, Boczkowski J. Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced drug delivery reviews* 2013; 65:2063-9.
6. Shvedova AA, Kagan VE, Fadeel B. Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50:63-88.
7. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140:313-26.
8. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* 2013; 368:651-62.
9. Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 20:474-94.
10. Cohignac V, Landry M, Boczkowski J, Lanone S. Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. *Nanomaterials* 2014; 4:548-82.
11. Ma X, Wu Y, Jin S, Tian Y, Zhang X, Zhao Y, Yu L, Liang XJ. Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS nano* 2011; 5:8629-39.
12. Yu JX, Li TH. Distinct biological effects of different nanoparticles commonly used in cosmetics and medicine coatings. *Cell Biosci* 2011; 1:19.
13. Bussy C, Paineau E, Cambedouzou J, Brun N, Mory C, Fayard B, Salome M, Pinault M, Huard M, Belade E, et al. Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10:24.
14. Yu KN, Kim JE, Seo HW, Chae C, Cho MH. Differential toxic responses between pristine and functionalized multiwall nanotubes involve induction of autophagy accumulation in murine lung. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 2013; 76:1282-92.
15. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445-544.
16. Shen HM, Mizushima N. At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in biochemical sciences* 2014; 39:61-71.
17. Liu HL, Zhang YL, Yang N, Zhang YX, Liu XQ, Li CG, Zhao Y, Wang YG, Zhang GG, Yang P, et al. A functionalized single-walled carbon nanotube-induced autophagic cell death in human lung cells through Akt-TSC2-mTOR signaling. *Cell Death Dis* 2011; 2:e159.
18. Duan J, Yu Y, Li Y, Wang J, Geng W, Jiang L, Li Q, Zhou X, Sun Z. Silica nanoparticles induce autophagy and endothelial dysfunction via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *International journal of nanomedicine* 2014; 9:5131-41.

19. Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SA, Chauhan LK, Ahmad I. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2012; 33:1477-88.
20. Roy R, Singh SK, Chauhan LK, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. *Toxicology letters* 2014.
21. Shi M, Cheng L, Zhang Z, Liu Z, Mao X. Ferroferric oxide nanoparticles induce prosurvival autophagy in human blood cells by modulating the Beclin 1/Bcl-2/VPS34 complex. *International journal of nanomedicine* 2015; 10:207-16.
22. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:7-12.
23. Newton PT, Vuppalapati KK, Boudierlique T, Chagin AS. Pharmacological inhibition of lysosomes activates the MTORC1 signaling pathway in chondrocytes in an autophagy-independent manner. *Autophagy* 2015; 11:1594-607.
24. Wu YL, Putcha N, Ng KW, Leong DT, Lim CT, Loo SC, Chen X. Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces. *Accounts of chemical research* 2013; 46:782-91.
25. Johnson-Lyles DN, Peifley K, Lockett S, Neun BW, Hansen M, Clogston J, Stern ST, McNeil SE. Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and applied pharmacology* 2010; 248:249-58.
26. Bussy C, Paineau E, Cambedouzou J, Brun N, Mory C, Fayard B, Salome M, Pinault M, Huard M, Belade E, et al. Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 2013; 10:24.
27. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 2009; 33:505-16.
28. Sala D, Ivanova S, Plana N, Ribas V, Duran J, Bach D, Turkseven S, Laville M, Vidal H, Karczewska-Kupczewska M, et al. Autophagy-regulating TP53INP2 mediates muscle wasting and is repressed in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 2014; 124:1914-27.
29. Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, Campello S, Nardacci R, Piacentini M, Campanella M, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell death and differentiation* 2015; 22:517.
30. Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, et al. Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLoS genetics* 2015; 11:e1005065.
31. Bardag-Gorce F, Francis T, Nan L, Li J, He Lue Y, French BA, French SW. Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life sciences* 2005; 77:2594-602.
32. Mu Q, Jiang G, Chen L, Zhou H, Fourches D, Tropsha A, Yan B. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chem Rev* 2014; 114:7740-81.
33. Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, Sesti F. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem* 2003; 278:50212-6.

34. Castro C., Pinault M., Porterat D., Reynaud C., M. M-LH. The role of hydrogen in the aerosol-assisted chemical vapor deposition process in producing thin and densely packed vertically aligned carbon nanotubes. *Carbon* 2013; 6:585-94.
35. Glory J, Bonetti M, Helezen M, Mayne-L'Hermite M, Reynaud C. Thermal and electrical conductivities of water-based nanofluids prepared with long multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Applied Physics* 2008; 103.
36. Kuwauchi Y, Yoshida H, Akita T, Haruta M, Takeda S. Intrinsic catalytic structure of gold nanoparticles supported on TiO₂. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012; 51:7729-33.
37. Armand L, Dagouassat M, Belade E, Simon-Deckers A, Le Gouvello S, Tharabat C, Duprez C, Andujar P, Pairon JC, Boczkowski J, et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Matrix Metalloprotease 1 in Human Pulmonary Fibroblasts Partly via an Interleukin-1beta-Dependent Mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48:354-63.

Table 1: Physico-chemical characteristics of the particles used

	Size	Crystal phase	Surface area (m ² /g)	Iron content (TGA) (weight %)	Zeta potential in water pH =7 (mV)	Hydrodynamic diameter in water (nm)	Endotoxin level	Intrinsic ROS production
S-CNT	26 nm x1.7 µm	Amorphous	/	4.4	/	/	ND	++
SF-CNT	25 nm x1.6 µm	Amorphous	/	1.3	/	/	ND	ND
L-CNT	24 nm x6.4 µm	Amorphous	/	4.5	/	/	ND	++
LF-CNT	25 nm x9.2 µm	Amorphous	/	1.0	/	/	ND	++
FW2	13 nm	Amorphous	373	/	-11.9	1033 ± 88	ND	ND
Micro	200 nm	Anatase	8	/	0.4	874 ± 149	ND	+
A10	10 nm	Anatase	96	/	-2.1	1020 ±146	ND	+
A/R	25-75 nm	Anatase:rutile (13:7)	27	/	0.2	715 ± 104	ND	+
Rut	5x20 nm	Rutile	160	/	-39.8	55 ± 20	ND	ND
P25	30 nm	Anatase:rutile (4:1)	50	/	-7.3	48 ± 19	ND	+
P25 - Au3	30 nm	Anatase:rutile (4:1)	57	/	-21.1	175 ± 103	ND	+
P25 - Au6	30 nm	Anatase:rutile (4:1)	57	/	-21.9	54 ± 34	ND	+

Data are given as mean±standard deviation when applicable. ND: not detectable; /: not done; +: low ROS production, ++: high ROS production.

Legend to figures

Figure 1: Particles characterization

A. TEM images of the particles. Scale bar: 50 nm **B-C.** Determination of CNT external diameter (**B**) and length (**C**) distributions.

Figure 2: Microscopy images of macrophages exposed to particles

TEM images of RAW 264.7 macrophages exposed to 50 µg/mL of particles for 6 hours. Scale bar: 500 nm. Black arrows point towards particles. Rapa: Rapamycin (100 nM).

Figure 3: Quantification of autophagy markers and autophagy flux

A. Representative western blot images of LC3 and p62 in RAW 264.7 macrophages exposed to 50 µg/mL particles for 6 hours. Actin was used as loading control. **B-C.** Quantification of protein expression levels for LC3-II (**B**) and p62 (**C**). **D.** Representative western blot images of LC3 in RAW 264.7 macrophages exposed to 50 µg/mL of particles for 6 hours in the presence or absence of bafilomycin A1 (Baf A1, final concentration: 100 nM). Actin was used as loading control. **E.** Quantification of protein expression levels for LC3-II. Data are given as mean ± SEM. *: $p < 0.05$ *versus* control condition.

Figure 4: Confocal analysis of autophagy flux

A. Confocal images of the transfected mRFP-GFP-LC3 plasmid in RAW 264.7 macrophages exposed to 10 µg/mL of particles for 6 hours. Scale bar: 10 µm. Autophagosomes: yellow puncta; autolysosomes: red puncta. **B.** Quantification of autophagosomes and autolysosomes number per cell in each condition. More than 30 cells were counted in each condition. Data are given as mean ± SEM. *: $p < 0.05$ *versus* control condition. Baf: Bafilomycin A1 (100 nM), Rapa: Rapamycin (100 nM).

Figure 5: Protein expression levels of autophagy initiation markers

A. Representative western blot images of beclin1, Atg5-Atg12 conjugate, pS6RP and of PTEN in RAW 264.7 macrophages exposed to 50 µg/mL particles for 6 hours. Actin was used as loading control. **B-E.** Quantification of protein expression levels for beclin1 (**B**), Atg5-Atg12 conjugate (**C**), p-S6RP (**D**) and PTEN (**E**). Data are given as mean ± SEM. *: $p < 0.05$ *versus* control condition.

Figure 6: Cytoskeleton analysis

Confocal images of RAW264.7 macrophages exposed to 10 µg/ml particles for 6 hours. Cells were stained with the anti- α -tubulin antibody. Scale bar: 5 µm. Noco: nocodazole (positive control, 15 µg/ml)

Figure 7: Evaluation of lysosomal number

A. Representative western blot images of LAMP1/2 and cathepsins B/D in RAW 264.7 macrophages exposed to 50 µg/mL particles for 6 hours. Actin was used as loading control. **B-E.** Quantification of protein expression levels for LAMP1 (**B**), LAMP2 (**C**), cathepsin B (**D**) and cathepsin D (**E**). Data are given as mean ± SEM. *: $p < 0.05$ *versus* control condition.

Figure 8: Tentative model of the effects of NP on the autophagy process

See text for details.

Supplementary information

Figure S1: Viability of macrophages exposed to particles

Quantification of cell viability in RAW 264.7 macrophages exposed to 10-100 µg/mL particles for 6 hours, by WST-1 (**A**) or Hoechst assay (**B**). Results are expressed as percentage of values obtained for the control condition (untreated cells). Data are given as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$ *versus* control condition.

Figure S2: Quantification of p62 expression

mRNA gene expression of p62 in RAW 264.7 macrophages exposed to 50 µg/mL particles for 6 hours. Data are given as mean \pm SEM. *: $p < 0.05$ *versus* control condition.

Figure 1

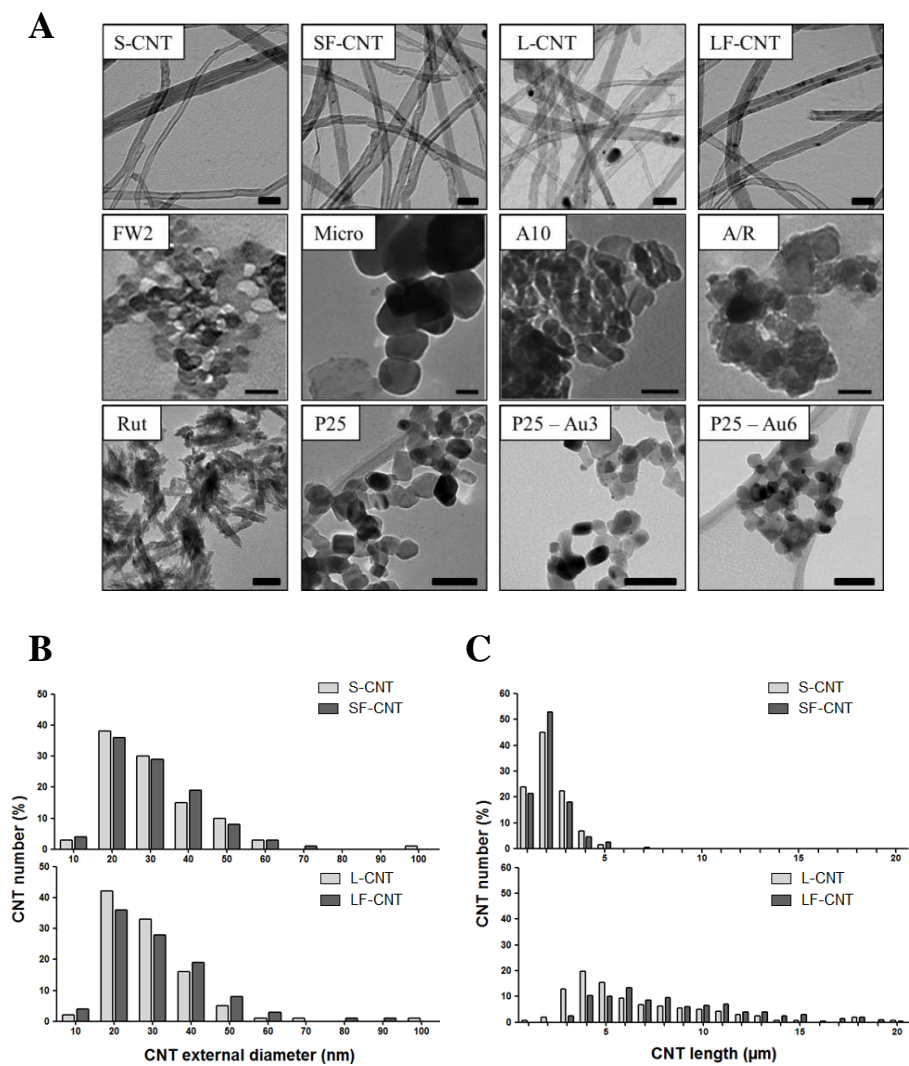


Figure 2

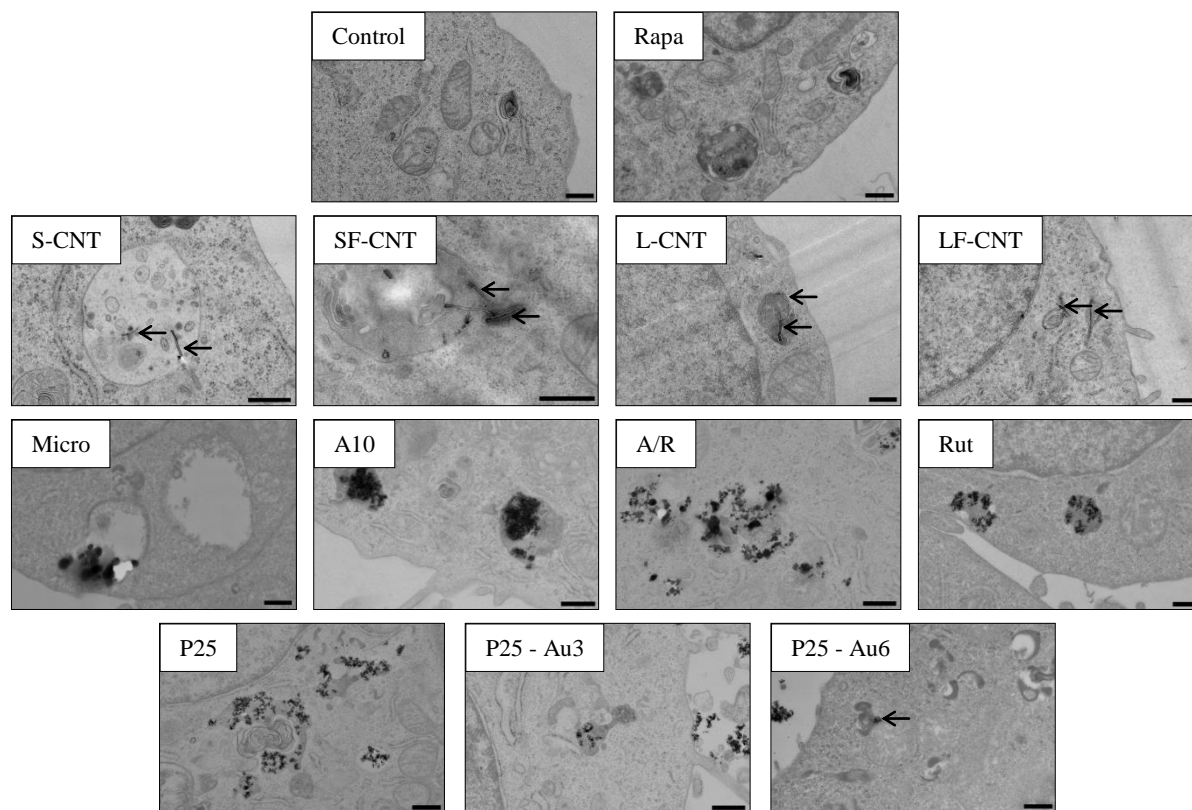


Figure 3

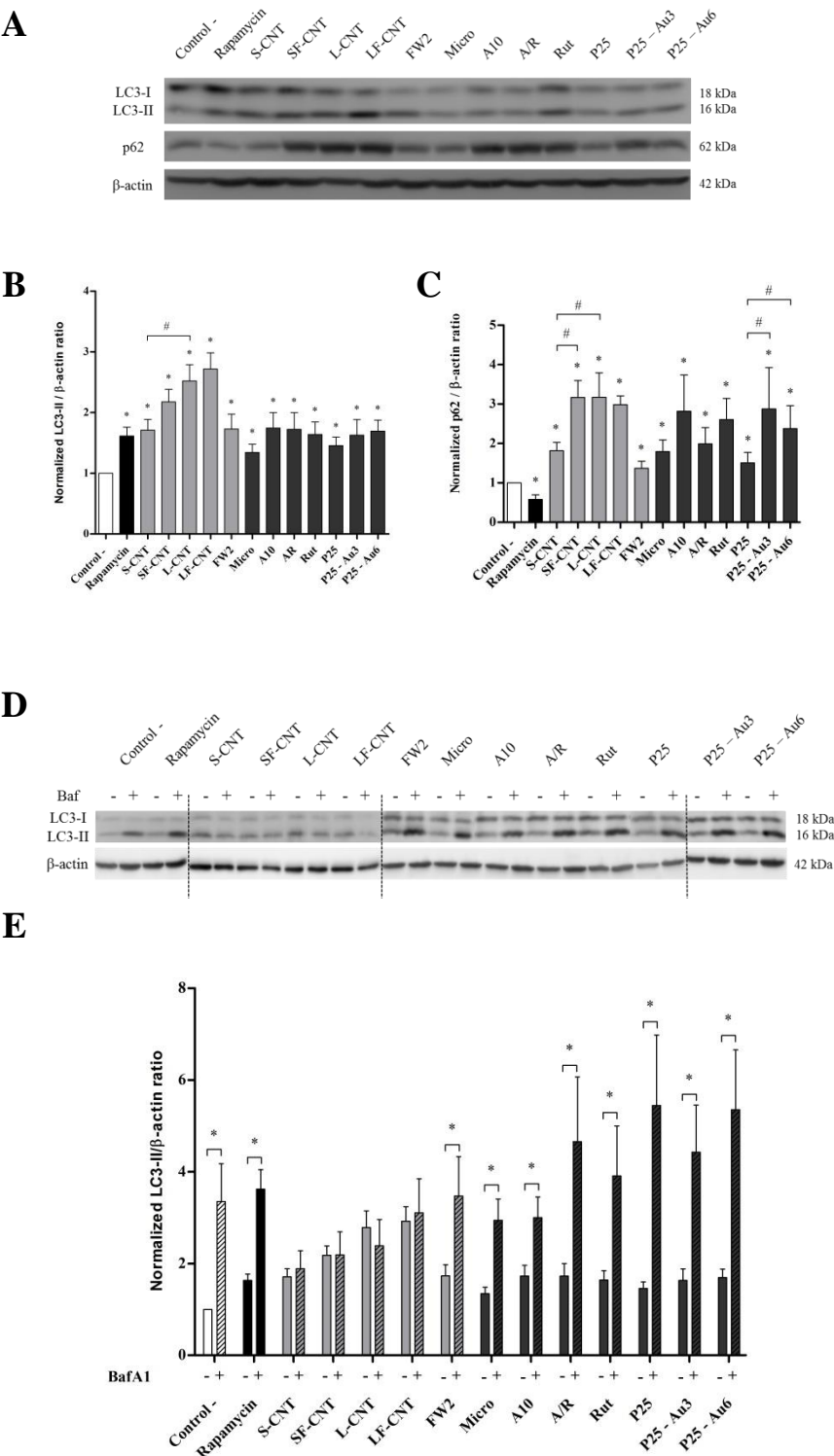
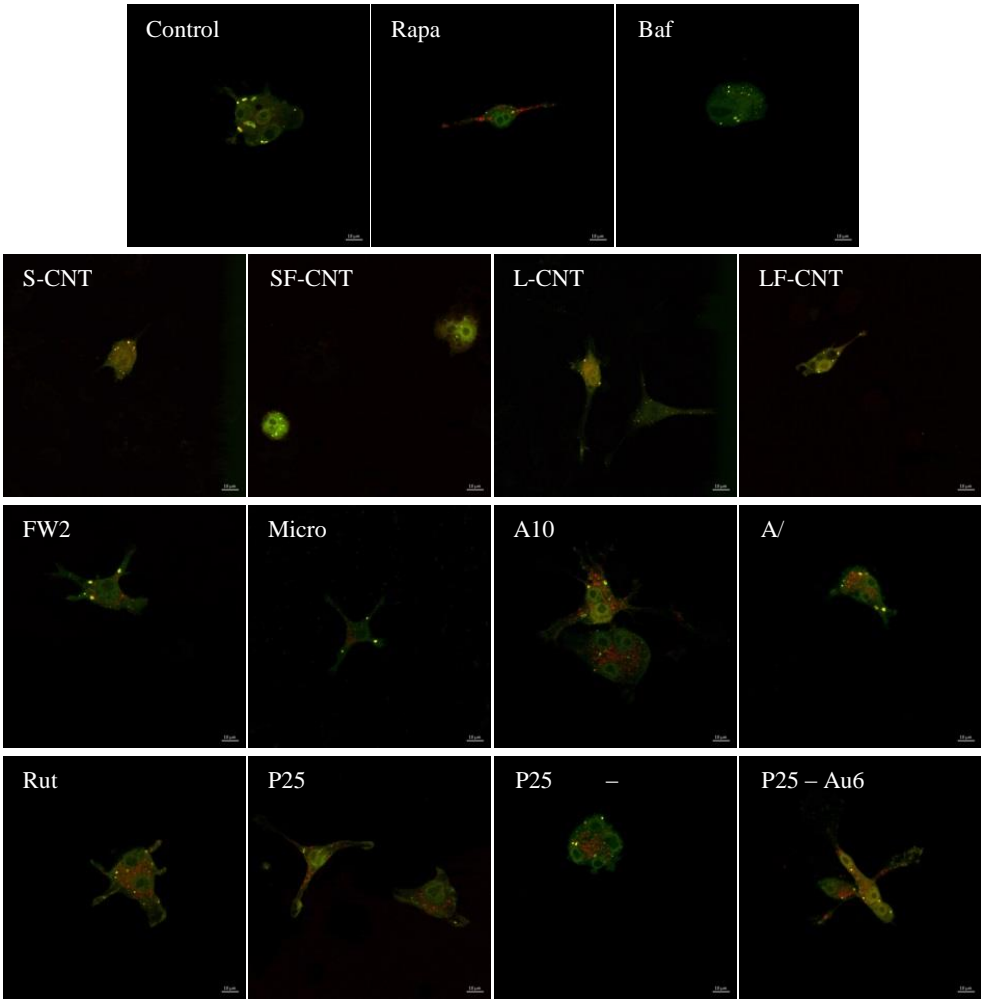


Figure 4

A



B

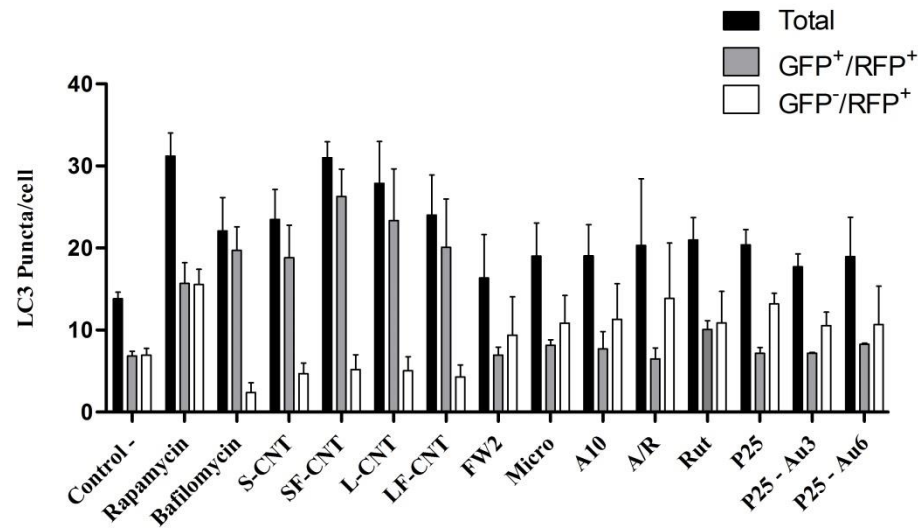


Figure 5

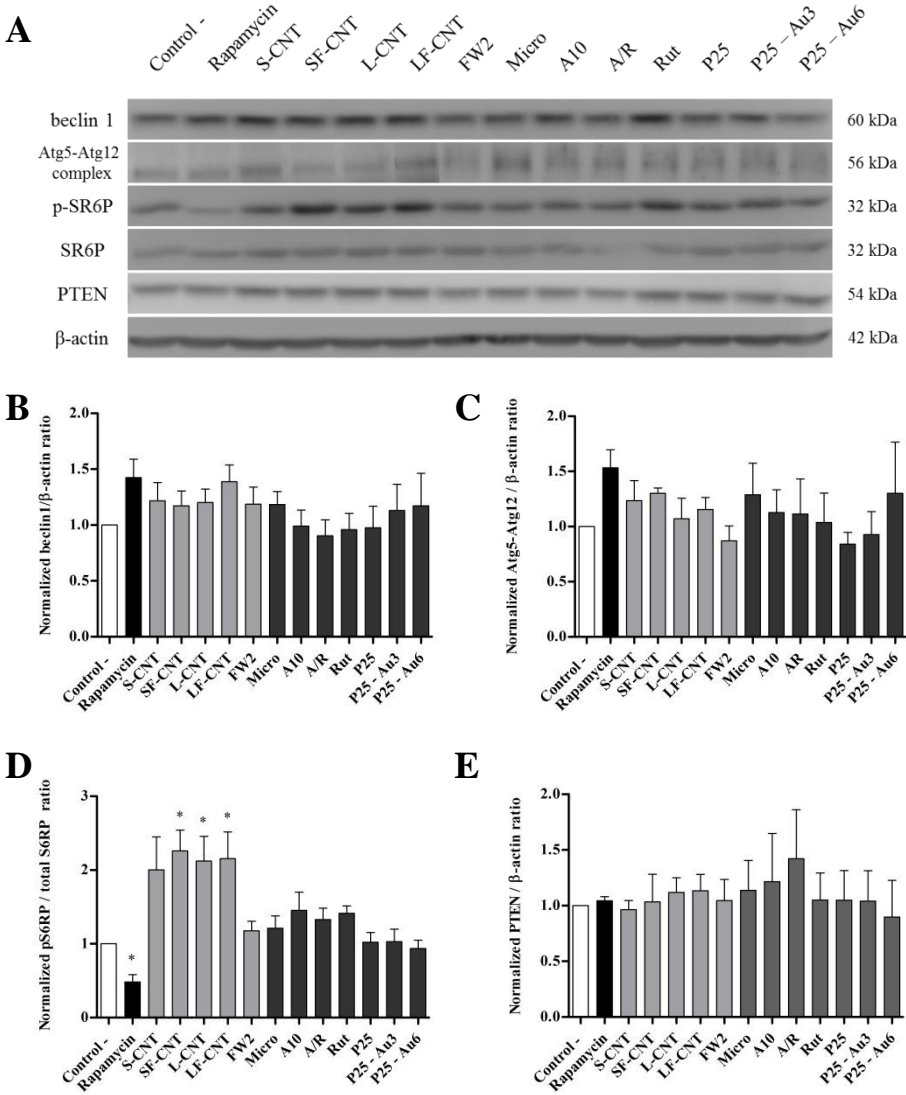


Figure 6

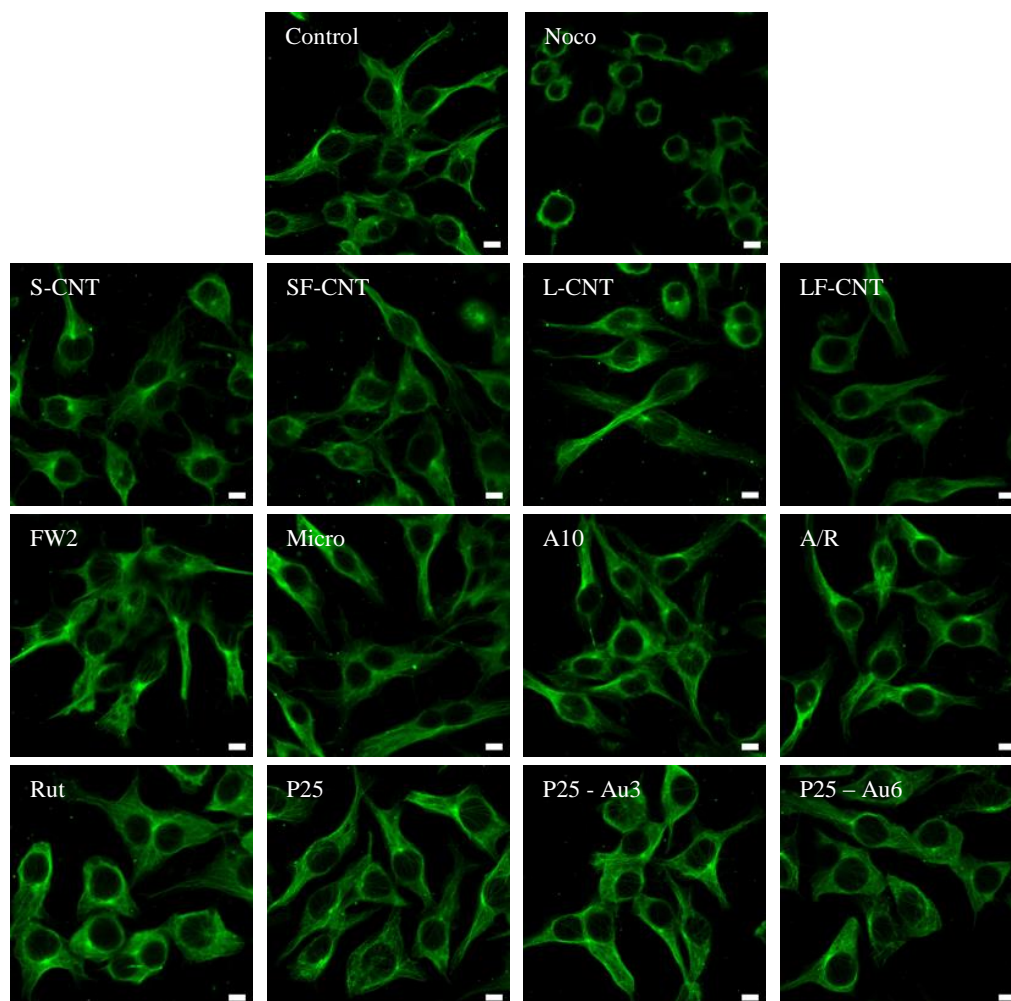


Figure 7

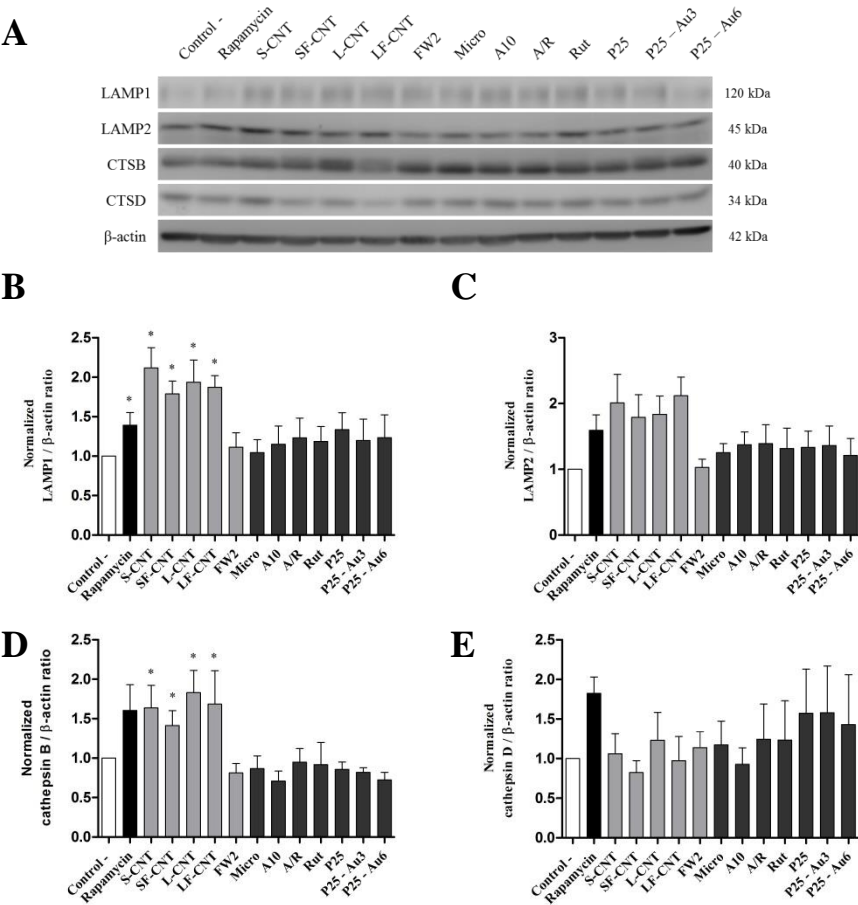


Figure 8

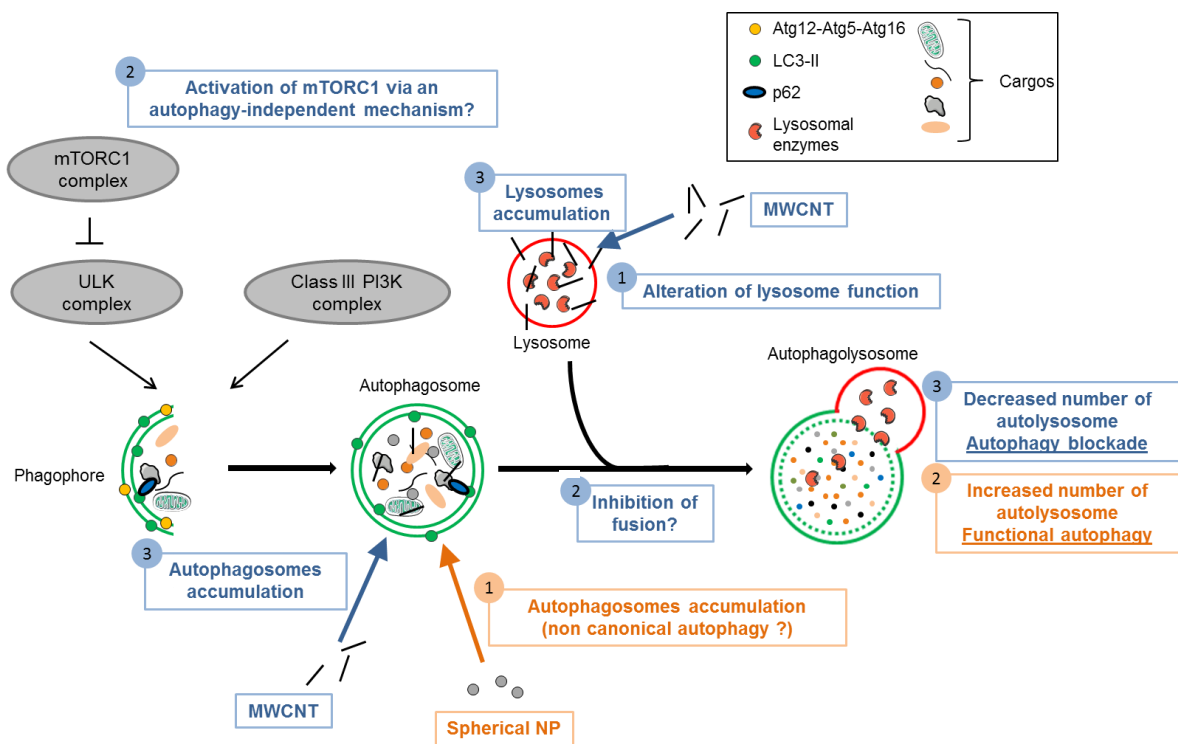


Figure S1

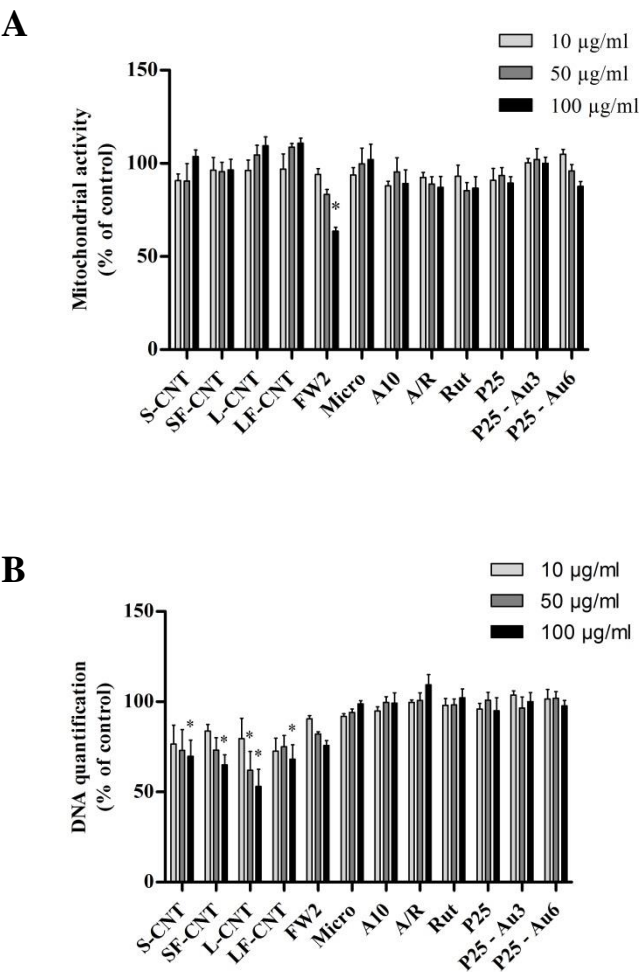
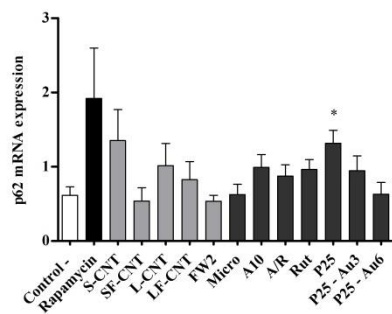


Figure S2



4.3. Résultats complémentaires

4.3.1. Modulation de l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie par les particules

Comme il a été vu précédemment, l'autophagie peut être divisée en plusieurs étapes : l'initiation du processus conduisant à la formation de l'autophagosome, son élongation, puis la fusion de ce dernier avec le lysosome pour former l'autolysosome dans lequel s'effectue la dégradation du contenu de l'autophagosome. Plus de 30 gènes sont impliqués dans la régulation de ce processus. Afin de compléter les résultats de notre article, nous avons examiné l'expression de certains de ces gènes en réponse à l'exposition aux particules.

4.3.1.1. Formation - élongation de l'autophagosome

Dans l'article, nous n'avions pas observé de changements de l'expression du conjugué Atg5-Atg12, impliqué dans l'élongation de l'autophagosome. Afin de confirmer que les particules étudiées ici n'intervenaient pas dans cette étape d'élongation, nous avons quantifié l'expression du gène codant pour la protéine Atg4, impliquée dans la maturation de la protéine LC3, nécessaire à la formation et à l'élongation de l'autophagosome. Aucune modification significative de l'expression du gène Atg4 n'a été observée après exposition des macrophages aux particules par rapport au contrôle (Figure 20a). De plus, l'expression du gène LC3, codant pour la protéine précurseur de LC3, est modulée de façon différente selon les particules (Figure 20b). Les nanotubes de carbone non fonctionnalisés (S-CNT et L-CNT) induisent une diminution significative de l'expression génique de LC3 alors que l'exposition aux mêmes nanotubes fonctionnalisés ne modifie pas l'expression de ce gène. L'exposition des macrophages à FW2 et aux particules de TiO₂ induit une légère augmentation de l'expression génique de LC3, significative pour A10, Rut, P25 – Au3 et P25 – Au6.

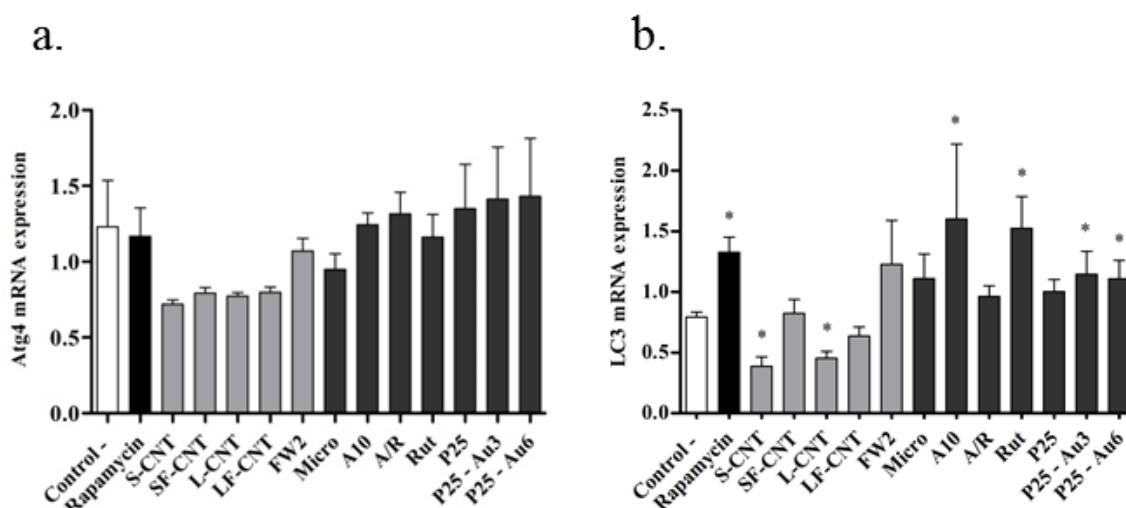


Figure 20 : Expression de gènes impliqués dans la formation et l'élongation de l'autophagosome

Quantification des gènes Atg4 (a) et LC3 (b) dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h. * : $p < 0,05$ comparé au contrôle.

4.3.1.2. Fusion autophagosome - lysosome

Après leur formation dans le cytoplasme, les autophagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes pour former les autolysosomes. Cette étape de fusion nécessite un transport correct des autophagosomes vers les lysosomes, notamment effectué *via* le réseau du cytosquelette. Dans notre article, nous n'avons pas observé de perturbation du réseau de microtubules, indiquant une absence de transport des structures et donc une absence de fusion entre celles-ci. Afin de mieux analyser l'étape de fusion de l'autophagosome et du lysosome, l'expression génique de plusieurs protéines (Stx17, SNAP29 et VAMP8) impliquées dans cette étape a été déterminée. Ces protéines sont des protéines de la famille des SNARE jouant un rôle dans la fusion membranaire ; Stx17 est recrutée par les autophagosomes et interagit avec la protéine cytosolique SNAP29, qui elle-même interagit avec VAMP8, localisée sur la membrane lysosomale. Cette interaction permet la réalisation de la fusion entre autophagosome et lysosome (Shen and Mizushima 2014). Aucune modification majeure de l'expression génique de ces trois protéines n'a été observée en réponse à nos particules. Nous avons cependant observé une diminution significative de l'expression de Stx 17 en réponse aux CNT non fonctionnalisés, associée à une augmentation de l'expression de SNAP29

(Figure 21). Ces résultats pourraient suggérer un défaut de fusion entre l'autophagosome et le lysosome en réponse à ces deux particules.

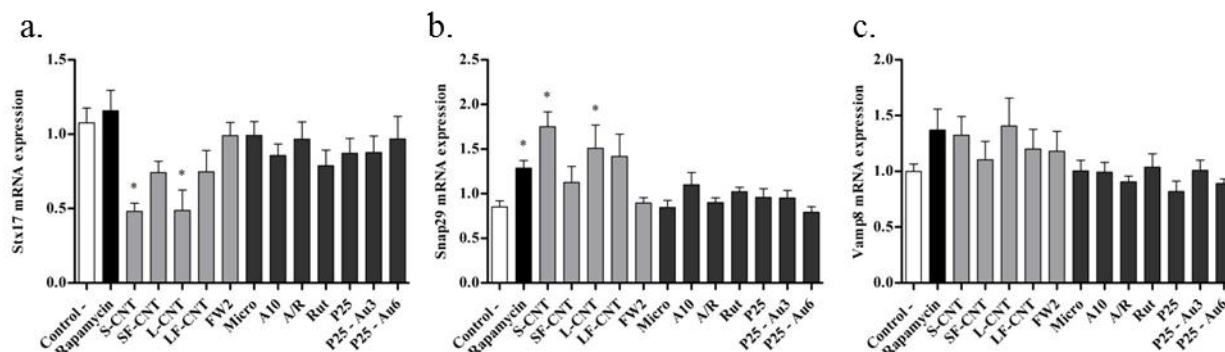


Figure 21 : Expression de gènes impliqués dans l'étape de fusion autophagosome-lysosome
Quantification des gènes codant pour Stx17 (a), SNAP29 (b) et VAMP8 (c) dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h. * : p < 0,05 comparé au contrôle.

4.3.1.3. Fonction et biogenèse du lysosome

Nous nous sommes ensuite intéressés à la fonction du lysosome. Nous avons montré dans l'article que les CNT induisaient une augmentation de l'expression de LAMP1 et de LAMP2, protéines constitutives de la membrane lysosomale. Celle-ci était associée à une augmentation de l'expression d'une enzyme lysosomale, la cathepsine B. Cependant, dans les macrophages traités avec FW2 ou avec les particules de TiO₂, nous n'observions pas de modulation (ou très peu) de l'expression de ces protéines lysosomales. Afin de vérifier, si l'augmentation protéique était liée à une transcription génique augmentée, nous avons également vérifié l'expression des gènes codant pour ces protéines et n'avons observé aucun changement significatif dans les cellules traitées aux particules par rapport au contrôle (Figure 22). Nous avons également mesuré l'activité des cathepsines totales et n'avons observé aucune différence de l'activité de ces enzymes dans les macrophages traités à nos particules.

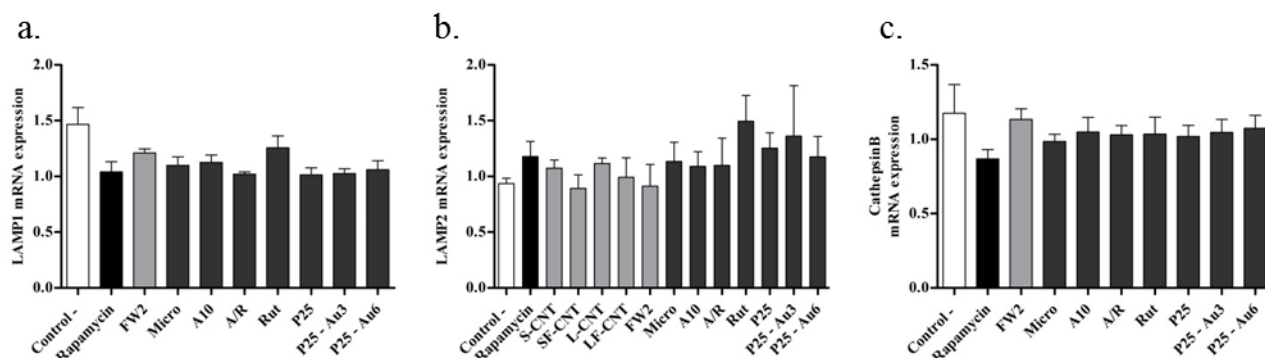


Figure 22 : Expression de gènes lysosomaux

Quantification des gènes codant pour LAMP1 (a), LAMP2 (b) et cathepsine B (c) dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h.

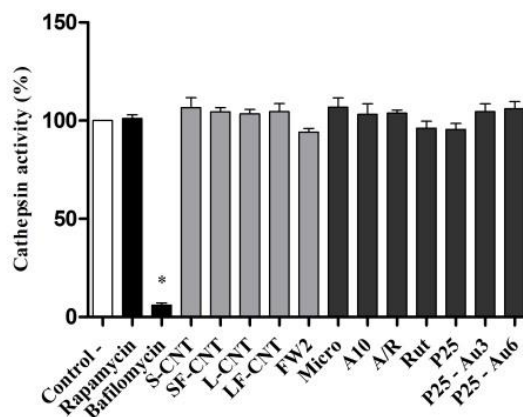


Figure 23 : Activité des cathepsines

Mesure de l'activité des cathepsines dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h. * : $p < 0,05$ comparé au contrôle

L'expression du gène TFEB, un facteur de transcription, a également été quantifiée en réponse à une exposition aux particules. TFEB est connu pour moduler l'autophagie, notamment en régulant la biogenèse des lysosomes, *via* son contrôle transcriptionnel de gènes codant pour des protéines associées à la membrane du lysosome ou encore codant pour des enzymes lysosomales. Le facteur de transcription TFEB est également connu pour réguler l'expression de certains gènes Atg (Shen and Mizushima 2014). L'expression du gène TFEB a été quantifiée dans les macrophages exposés aux particules et une diminution significative de la transcription de ce gène a été relevée seulement dans le cas des cellules traitées avec les

CNT non fonctionnalisés (Figure 24). Ces résultats suggèrent un défaut de la biogenèse lysosomale en réponse à ces particules, cependant ces données n'étant basées que sur l'expression génique, il faudrait confirmer ces résultats en analysant également l'expression de la protéine TFEB.

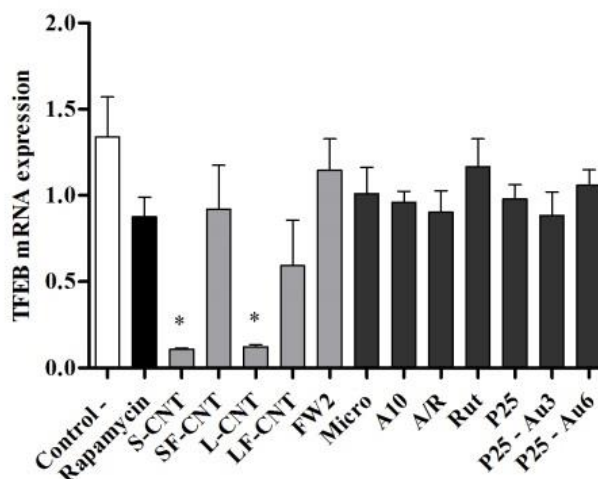


Figure 24 : Expression de TFEB

Quantification du gène TFEB dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h.

4.3.2. Stress oxydant et particules

L'induction d'un stress oxydant est une des conséquences principalement décrite suite à une exposition à des NP. Comme évoqué précédemment dans ce manuscrit, la présence d'un stress oxydant peut être potentiellement liée au processus autophagique. En effet, nous avons vu que l'induction d'un stress oxydant pouvait stimuler le processus autophagique mais aussi que l'autophagie pouvait réguler de façon négative le stress oxydant. Afin de déterminer le rôle possible de l'autophagie dans la réponse oxydante suite à l'exposition aux NP, nous avons évalué plusieurs paramètres caractéristiques de la réponse oxydante. En premier lieu, l'expression génique de plusieurs protéines anti-oxydantes (HO-1, SOD-1 et SOD2) a été déterminée (Figure 25). De plus, l'expression protéique de HO-1 a également été évaluée (Figure 26). L'expression du gène HO-1 est significativement augmentée dans les macrophages exposés aux CNT et reste inchangée dans les macrophages exposés à FW2 et aux particules de TiO₂ (Figure 25). Ceci s'accompagne d'une augmentation significative de

l'expression protéique de HO-1 en réponse aux CNT. L'expression de cette protéine est également légèrement augmentée en réponse à FW2 et aux particules de TiO₂, toutefois cette augmentation est significative seulement pour Rut, P25 – Au3 et P25 – Au6. L'expression génique de SOD-1 et SOD-2 est modifiée seulement dans les macrophages traités avec les CNT non fonctionnalisés (S-CNT et L-CNT) : nous observons une légère diminution de SOD-1 en réponse à ces deux CNT tandis que l'expression de SOD-2 est significativement augmentée. Aucune modification de l'expression de ces deux gènes n'est observée en réponse aux autres particules. Ces résultats suggèrent que les MWCNT induiraient une réponse oxydante plus importante que les particules sphériques.

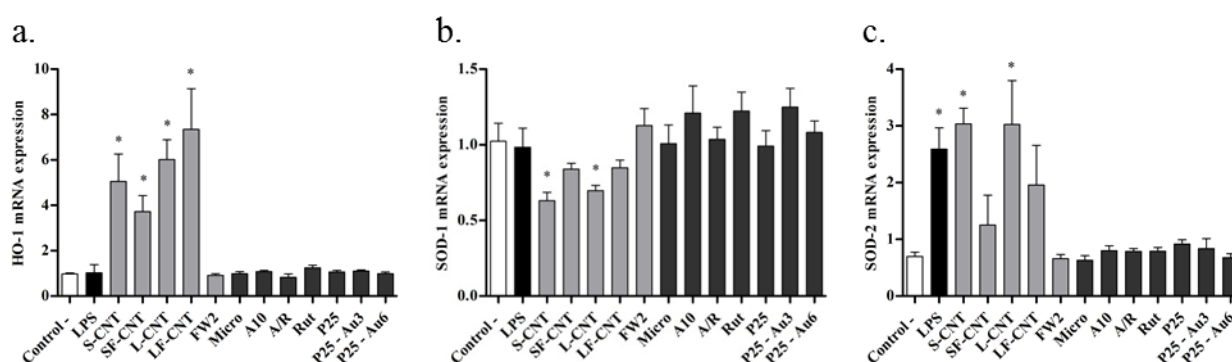


Figure 25 : Expression de gènes impliqués dans la réponse anti oxydante

Quantification des gènes codant pour HO-1 (a), SOD-1 (b) et SOD-2 (c) dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h. * : $p < 0,05$ comparé au contrôle.

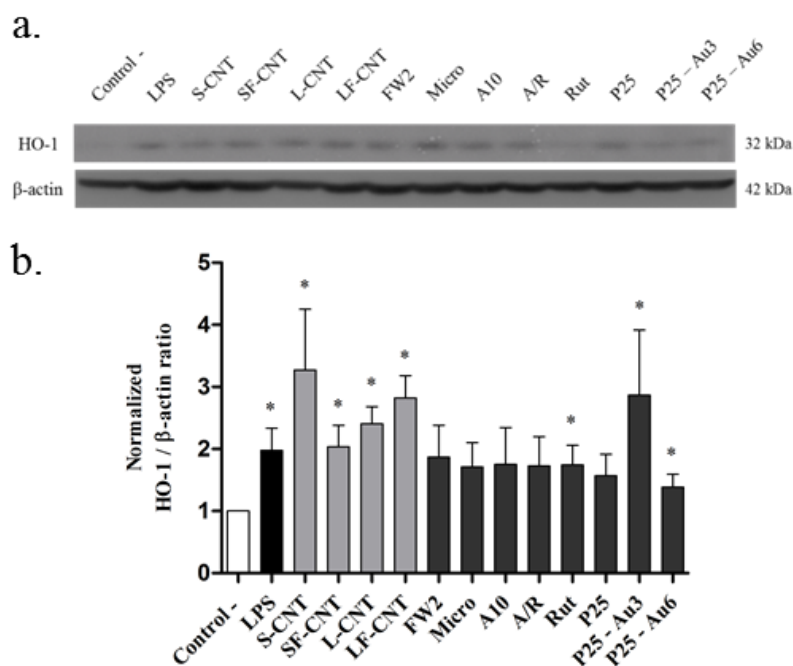


Figure 26 : Expression protéique de HO-1

Western blot représentatif de l'analyse de l'expression de la protéine HO-1 (a) et quantification de l'expression de HO-1 (b.) dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h.

L'actine est utilisé comme témoin de charge.* : $p < 0,05$ comparé au contrôle.

LPS : lipopolysaccharide (utilisé comme témoin positif de stress oxydant)

4.3.3. Inflammation et particules

En plus du stress oxydant, une réponse inflammatoire est souvent décrite suite à une exposition à des NP. Afin de déterminer le rôle éventuel de l'autophagie dans l'induction de cette réponse inflammatoire, l'expression génique et/ou la production de plusieurs cytokines inflammatoires ont été évaluées.

TNF- α , IL-1 β et IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages afin de stimuler la réponse inflammatoire. L'expression des gènes codant pour ces trois protéines est significativement augmentée par rapport au contrôle après exposition aux CNT (Figure 27). De plus, l'expression d'IL-1 β est augmentée également de façon significative en réponse à FW2 et aux NP de TiO₂, dans des proportions toutefois moins importantes qu'avec le traitement par les CNT. De façon intéressante, une différence significative est observée entre S-CNT et SF-CNT pour l'expression des gènes IL-1 β et IL-6, S-CNT induisant une réponse inflammatoire plus importante que SF-CNT. De même, la NP de TiO₂ P25 semble

induire une réponse inflammatoire plus importante que P25 – Au6. De façon cohérente, la production pour plusieurs protéines de l'inflammation est également significativement augmentée en réponse aux CNT, et en proportions moins importantes, en réponse aux NP de TiO₂ (Figure 28). Aucune différence significative n'a été observée à l'intérieur des deux groupes de particules étudiées.

IL-18 est une cytokine pro inflammatoire produite en même temps qu'IL-1 β par l'intermédiaire de complexes multi protéiques permettant leur maturation (par clivage) et appelés inflammasomes. Un des inflammasomes le plus connu est celui composé de NLRP3. D'après la Figure 27 d. et e., une légère augmentation de l'expression de NLRP3 est observée en réponse à A/R et P25. Aucun changement d'expression du gène IL-18 n'est observé.

MCP-1 (CCl2) et MIP-2 (CXCL2) sont des cytokines produites par les macrophages pour recruter les cellules immunitaires sur le site d'inflammation. L'expression du gène MCP-1 est fortement augmentée suite à l'exposition aux CNT, cependant celle-ci n'est peu voire pas modifiée en réponse à FW2 et aux particules de TiO₂ (Figure 27f). La production de cette protéine (non évaluée en réponse aux CNT) n'est également pas modifiée suite à l'exposition à FW2 et aux particules de TiO₂ (Figure 28c). De plus, la production de MIP-2 est augmentée en réponse à toutes les NP, mais de façon bien plus importante pour les CNT que pour FW2 et les NP de TiO₂.

Le TGF- β est une cytokine produite par les macrophages et participant à la réponse immunitaire. Nous avons observé une légère diminution, cependant significative, de l'expression du gène codant pour le TGF- β dans les macrophages exposés à toutes les particules de TiO₂ et à FW2 (Figure 27g, expression non évaluée avec traitement par les CNT).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'exposition à l'ensemble des NP étudiées (donc excepté Micro) peut induire une réponse inflammatoire. Cette réponse semble dépendre des propriétés physico-chimiques des NP. En effet, celle-ci est beaucoup plus importante dans les macrophages exposés aux CNT que dans ceux exposés aux NP de TiO₂. De plus, les CNT non fonctionnalisés induisent une réponse inflammatoire plus importante que les fonctionnalisés. Par ailleurs, P25 semble induire une réponse inflammatoire plus importante que P25 – Au6.

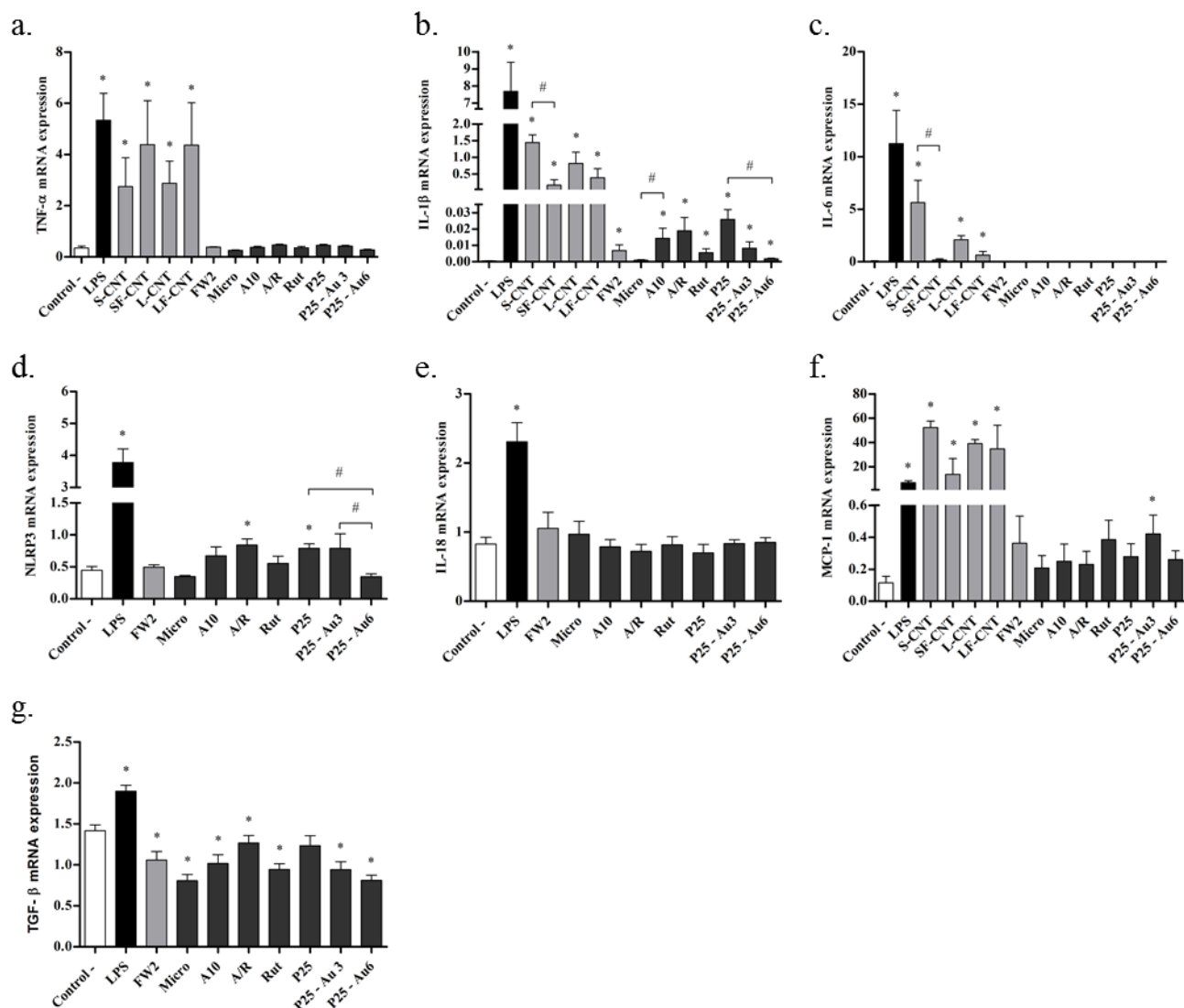


Figure 27 : Expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire

Quantification des gènes codant pour TNF- α (a), IL-1 β (b), IL-6 (c), NLRP3 (d), IL-18 (e), MCP-1 (f) et TGF- β (g) dans des macrophages murins exposés à 50 μ g/ml de particules pendant 6h. * : $p < 0,05$ comparé au contrôle. LPS : lipopolysaccharide (utilisé comme témoin positif d'inflammation).

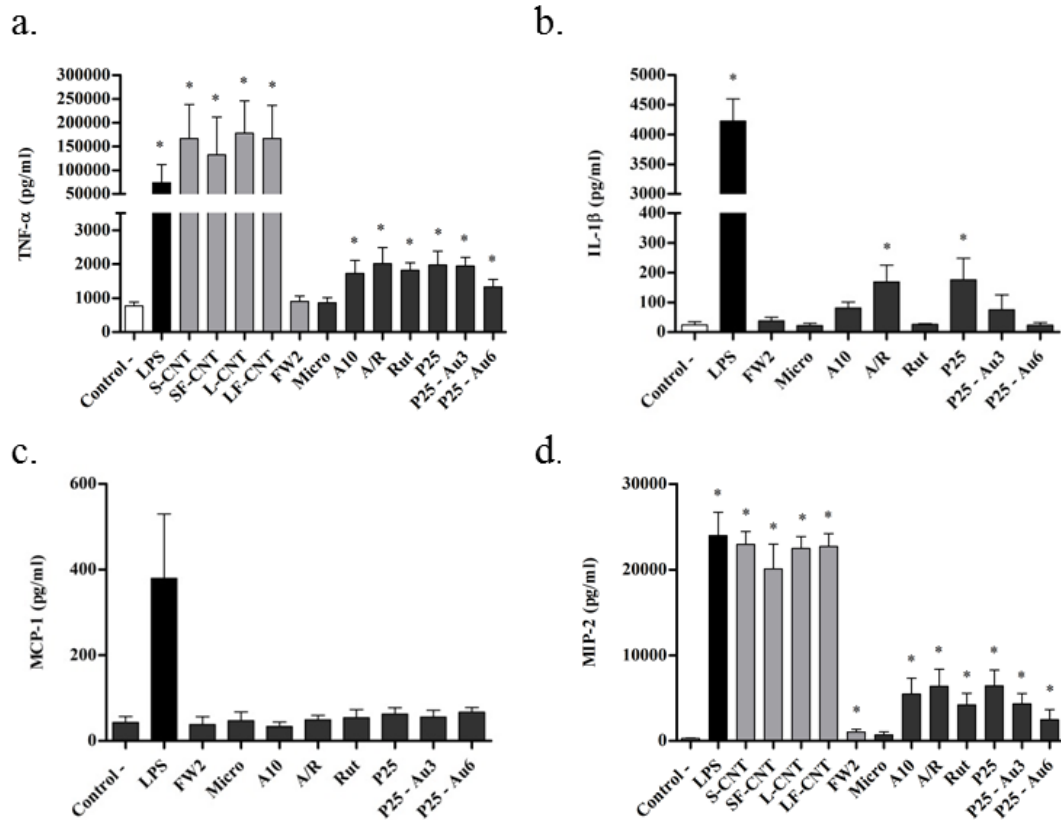


Figure 28 : Production de cytokines inflammatoires

Production extracellulaire de TNF-α (a.), IL-1β (b.), MCP-1 (c.) et MIP-2 (d.) dans des macrophages murins exposés à 50 µg/ml de particules pendant 6h. * : p < 0,05 comparé au contrôle.

LPS : lipopolysaccharide (utilisé comme témoin positif d'inflammation)

CHAPITRE 5

5. Discussion

5.1. Discussion méthodologique

5.1.1. Caractérisation des particules utilisées

Dans ce travail, 12 particules aux paramètres physico-chimiques variés ont été utilisées : 4 MWCNT (courts, courts fonctionnalisés, longs et longs fonctionnalisés : S-, SF-, L-, LF-CNT respectivement), une NP de noir de carbone (FW2), une particule de TiO₂ de taille micrométrique (Micro) et 6 NP de TiO₂ (A10, A/R, Rut, P25, P25 - Au₃, P25 - Au₆). L'utilisation de ces particules nous permet d'évaluer l'impact des différents paramètres physico-chimiques sur l'effet des NP : la taille/longueur (TiO₂ micrométrique vs NP de TiO₂ et CNT courts vs longs), la composition chimique (NP carbonées vs NP de TiO₂), la forme (tube vs particules sphériques), la structure cristalline des NP de TiO₂ (anatase vs rutile vs mix anatase/rutile), et leurs propriétés de surface avec P25 vs P25 - Au₃ vs P25 - Au₆ d'une part et des CNT avec addition ou non de groupes carboxyliques à leur surface (-COOH) d'autre part. Toutes ces NP, en différant d'un seul paramètre physico-chimique à la fois, nous permettaient ainsi de connaître l'influence de chaque paramètre sur la réponse biologique étudiée. Cependant, après caractérisation physico-chimique des NP, il est apparu quelques différences avec les données des fournisseurs. Par exemple, la particule de TiO₂ 100% rutile (Rut), décrite en tant que particule sphérique à l'achat s'est révélée être en forme de bâtonnets après observation au MET. La forme des particules influant également sur leur comportement et donc sur leur toxicité, il est donc finalement difficile de comparer *stricto sensu* les NP anatase et rutile en prenant seulement en compte la variété cristalline. Il est en fait difficile d'obtenir des NP ne se différenciant que sur un seul paramètre à la fois, étant donné que chaque paramètre est finalement interdépendant des autres. Cependant, et grâce à la grande variété de NP étudiées dans ce travail, il nous a tout de même été possible d'avoir une idée sur le ou les paramètres décisif(s) dans la toxicité des NP. Ces paramètres connus, il serait, par la suite, intéressant de synthétiser des NP « à façon » pour confirmer les hypothèses sur l'effet spécifique de tel ou tel paramètre sur telle ou telle réponse biologique.

Un des problèmes majeurs dans la plupart des études nanotoxicologiques menées jusqu'à ce jour est le manque de caractérisation des NP étudiées. Cette caractérisation est essentielle pour la fiabilité et la comparabilité des résultats dans les différentes études. En

effet, sans caractérisation, les études nanotoxicologiques auront une pertinence limitée en raison de la variabilité des effets des NP selon leurs propriétés physico-chimiques et les conditions expérimentales (Cong et al. 2011). De plus, cette caractérisation est d'autant plus importante dans les études toxicologiques ayant pour but de comparer les réponses cellulaires induites par différents types de NP, comme nous l'avons fait dans ce travail. En 2012, des recommandations ISO ont été publiées quant aux paramètres physico-chimiques à évaluer avant d'effectuer des évaluations toxicologiques (ISO/TR 2012). Ces recommandations comprennent une liste de huit paramètres : la taille des NP et leur distribution, l'état d'agrégation et d'agglomération des NP dans le milieu étudié, la forme, la surface spécifique, la composition chimique, la chimie de surface, la charge de surface et la solubilité. Dans cette étude, et grâce à l'étroite collaboration existante entre notre laboratoire et le laboratoire Francis Perrin au CEA de Saclay, une caractérisation approfondie des NP utilisées a pu être réalisée. En effet, la taille, la composition chimique, et la structure cristalline des NP ont été caractérisées via des méthodes de références : MET, MEB couplé à une analyse EDX et DRX. De plus, la surface spécifique des NP en poudre a été évaluée par méthode BET. L'état d'agrégation et d'agglomération des particules a également été évalué en mesurant le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta des NP dans l'eau mais aussi dans du milieu de culture en utilisant la méthode de DLS. Bien que beaucoup d'études ne mesurent ce paramètre que dans le milieu de dispersion (par exemple l'eau), il est primordial de les analyser également dans le milieu utilisé au moment des expériences (milieu de culture cellulaire, sérum physiologique ...). En effet, le changement de milieu dans lequel se trouvent les NP peut modifier leurs paramètres physico-chimiques (notamment le potentiel zêta et leur état d'agglomération) et donc modifier leur toxicité (Cong et al. 2011). Par ailleurs, les NP sont capables de produire des ROS en conditions acellulaires, ce qui peut fortement influencer leurs réponses cellulaires. C'est pourquoi nous avons mesuré la production de ROS intrinsèques aux NP. Enfin, des contaminations par les endotoxines pouvant survenir lors de la manipulation des poudres de NP, il peut y avoir mise en évidence de faux positifs lors de l'analyse de la réponse inflammatoire (Singh et al. 2007; Xia et al. 2006). Nous avons donc dosé les niveaux d'endotoxines dans les suspensions de NP préparées.

Notre caractérisation est bien étayée et devrait donc permettre une bonne comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature. Néanmoins, afin de compléter cette caractérisation, il aurait été intéressant d'analyser le potentiel zêta et la surface spécifique des CNT. De plus, il aurait également été intéressant d'analyser le devenir structural des NP une fois internalisées dans les cellules. Autrement dit, de comparer les paramètres physico-chimiques des NP avant

et après exposition cellulaire afin de conclure sur des éventuelles biotransformations des NP. En effet, l'étude de Bussy et al a démontré l'implication du pH lysosomal dans le détachement de NP à base de fer de SWCNT (Bussy et al. 2013b).

5.1.2. Modèle cellulaire utilisé

La voie respiratoire étant le mode d'entrée principal de l'exposition non intentionnelle aux NP, il nous paraissait judicieux de travailler sur un modèle cellulaire pulmonaire. Les NP sont déposées majoritairement dans la région alvéolaire où elles peuvent interagir avec les macrophages alvéolaires (Buzea et al. 2007), première ligne de défense contre les contaminations aériennes (virus, bactéries, particules, toxiques...) ayant échappé au filtre des voies aériennes supérieures. Nous avons choisi de travailler sur une lignée cellulaire murine, dans l'optique d'expérimentations animales ultérieures sur la souris : la lignée cellulaire murine de macrophages péritonéaux RAW264.7. Ces macrophages sont issus de la cavité péritonéale de souris BALB/c auxquelles a été inoculé le virus Mulv (Raschke et al. 1978). Il aurait pu être envisagé de travailler sur une lignée de macrophages murins alvéolaires, comme, par exemple, la lignée MH-S, obtenue à partir de macrophages issus de lavages broncho-alvéolaires de souris BALB/c. Cependant, et dans l'optique de validation des résultats sur cultures primaires (travaux en cours), le choix de la lignée RAW264.7 nous paraissait plus judicieux. En effet, le nombre de cellules isolées via des lavages broncho-alvéolaires est très faible et nécessiterait un nombre d'animaux élevé pour envisager une culture primaire à partir de ces cellules. Au contraire, les macrophages issus de la cavité péritonéale sont beaucoup plus nombreux et permettent des expériences en culture plus larges. Le choix d'une lignée de macrophages péritonéaux nous permettait alors de pouvoir relier les réponses biologiques observées *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, la lignée RAW264.7 est un modèle cellulaire reconnu, notamment pour l'analyse de la réponse inflammatoire (Hartley et al. 2008), mécanisme largement décrit comme sous-jacent à la toxicité des NP. Finalement, cette lignée de macrophages murins a déjà été utilisée pour l'étude de la toxicité des NP, notamment des NP de TiO₂ et des MWCNT (Reisetter et al. 2011; Rossi et al. 2010; Xiong et al. 2013; Yu et al. 2013a), et dans la réponse autophagique aux NP (Chen et al. 2012), ce qui devrait permettre une bonne comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature.

Les macrophages participent à la réponse immune innée, qui inclut entre autres l'élimination de pathogènes par phagocytose et qui se définit comme l'internalisation de

particules comme des débris cellulaires, des cellules apoptotiques ou des pathogènes, dans des phagosomes (Sarantis and Grinstein 2012). Le contenu des phagosomes peut être dégradé par la fusion des phagosomes avec des endosomes tardifs et/ou des lysosomes, organites tous deux impliqués dans l'autophagie (Gong et al. 2012). Il n'est donc pas surprenant que les mécanismes de phagocytose et d'autophagie s'entrecroisent (Oczypok et al. 2013). Ces particularités des macrophages rendent ce modèle cellulaire particulièrement pertinent pour l'étude de l'autophagie dans les effets des NP.

Dans un souci de validation des données, les résultats obtenus dans la lignée de macrophages RAW264.7 pourraient être vérifiés ultérieurement dans des macrophages primaires issus de la cavité péritonéale de souris C57Bl6 et de souris LysMCre^{+/-} Atg5^{flox/flox}. Ces souris transgéniques, déficientes pour l'autophagie, nous permettraient de compléter nos recherches sur les liens possibles entre l'autophagie et les autres effets des NP, notamment les réponses inflammatoires et oxydantes. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier les effets des NP sur d'autres modèles cellulaires représentatifs de l'épithélium alvéolaire, comme les pneumocytes de type II, cellules pouvant également être en contact direct avec les NP. Des expériences de co-cultures (macrophages- pneumocytes de type II) sont également envisagées afin de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques.

5.1.3. Mode d'exposition aux NP

Les cellules ont été exposées aux NP dans un milieu liquide, mode d'exposition classique utilisé dans les études toxicologiques. Cependant, ce modèle cellulaire présente certaines limites pour étudier la toxicité des NP au niveau pulmonaire. En conditions physiologiques, les NP arrivent au niveau des alvéoles pulmonaires via l'air inspiré, or dans notre modèle, les NP sont en suspension dans le milieu de culture. L'agglomération et le dépôt des particules en milieu liquide sont régis par des lois différentes et sont ainsi très différents de ce qui se passe en milieu gazeux, dans le poumon (Frohlich and Salar-Behzadi 2014). Il existe des systèmes d'exposition *in vitro* plus représentatifs des conditions physiologiques : la culture ALI (*air-liquid interface*). Il s'agit de cultiver les cellules sur des inserts perméables, placés dans des puits de culture, où le milieu est seulement présent du côté basal des cellules. Les cellules sont alors exposées par aérosol du côté apical. L'exposition des cellules respiratoires par le système de culture ALI a tout d'abord été utilisée pour évaluer

les effets des particules diesel (Bakand et al. 2006) mais est de plus en plus utilisée de nos jours pour évaluer les effets des NP (Jing et al. 2015; Panas et al. 2014). Il a par ailleurs été montré que, même si les effets observés dans le cas d'une culture ALI étaient du même type que ceux observés avec une culture submergée, ceux-ci étaient quantitativement plus faibles (Panas et al. 2014). Toutefois, et bien que se rapprochant plus des conditions d'exposition réelles, ce système d'exposition ALI possède plusieurs inconvénients. En effet, ce système est plus complexe que la culture submergée car il nécessite obligatoirement un confinement plus strict afin d'éviter toute exposition humaine potentielle lors des tests. Ce système nécessite donc l'acquisition de matériel spécifique confiné comme des chambres d'exposition. De plus, la complexité de ces chambres d'exposition ne permet pas un contrôle étroit de la dose administrée aux cellules étant donné que des pertes peuvent survenir dans le système d'exposition. En outre, ce système n'est valable que pour les cellules polarisées comme les cellules épithéliales, et ne peut donc s'appliquer sur des macrophages. Ainsi, la culture classique nous a paru le choix le plus pertinent pour cette étude.

Dans ce travail, nous avons choisi d'exposer les cellules aux NP dans un milieu de culture sans sérum. Les macrophages sont cultivés en présence de sérum dans le milieu de culture (environ 10%) afin de favoriser la croissance et la division cellulaire. Cependant, le sérum de veau fœtal utilisé en culture contient une grande variété de protéines, pouvant interagir avec les NP en formant une corona protéique et ainsi modifier le comportement des NP. Ainsi, pour éviter tout biais d'interprétation, les expositions cellulaires se sont déroulées sans sérum. L'absence de celui-ci dans le milieu de culture des macrophages est d'ailleurs préconisée dans un rapport sur l'utilisation de procédures standardisées dans l'étude de la toxicité des NP *in vitro* (Nanocare 2008). Il est par ailleurs également recommandé de compléter le milieu de culture en phosphatidylcholine, un composant majeur du surfactant pulmonaire, afin de mimer les conditions d'exposition *in vivo*, dans les poumons.

L'absence de sérum peut entraîner un jeûne des cellules conduisant à une stimulation de l'autophagie. Le fait d'exposer les cellules aux NP dans un milieu sans sérum peut ainsi avoir un effet indépendant des NP sur le processus autophagique et potentiellement conduire à une induction de l'autophagie. Cependant, le milieu de culture, même dépourvu de sérum, contient tout de même des acides aminés et du glucose, sources d'énergie pour la cellule. Les cellules n'étant pas en jeûne total, une sur-induction de l'autophagie est peu probable dans nos conditions de culture. Des tests cinétiques ont été réalisés (données non présentées) afin de choisir le temps d'exposition le plus approprié pour pouvoir observer les effets biologiques

des NP sans toutefois être en présence d'une sur-induction de l'autophagie due aux conditions de culture. Le temps choisi a été celui de 6h d'exposition.

5.1.4. Doses utilisées

La dose administrée et le temps d'exposition sont des paramètres fondamentaux lors de tests de toxicité. Cependant, ces paramètres restent difficiles à choisir au vu du faible nombre d'études sur les concentrations de NP dans l'air ambiant et sur les doses auxquelles l'être humain est exposé, que ce soit au travail ou dans la vie de tous les jours. Dans ce travail, et pour la majorité de nos expériences, nous avons choisi d'exposer les cellules à une dose de 50 µg/ml de NP pendant un temps de 6h. En effet, après des tests de cytotoxicité, cette dose s'est révélée non cytotoxique et se situe dans la gamme des concentrations utilisées dans les études *in vitro* concernant les effets des NP de TiO₂ et des CNT. Un grand nombre d'études utilisent des doses allant de 0,25 à 100 µg/ml de NP, voire, dans certains cas, jusqu'à des valeurs extrêmes de plusieurs mg/ml (Johnston et al. 2009). Cependant, il apparaît de plus en plus que ces doses sont trop élevées et peu représentatives d'une exposition réelle (Oberdorster 2012). En effet, il a été montré que la dose de NP reçue par les macrophages alvéolaires après une inhalation de 24 heures chez le rat était faible. Après une inhalation de NP à une concentration de 100 µg/m³ (la limite d'exposition maximale recommandée pour les NP de TiO₂ étant de 300 µg/m³ (NIOSH 2011)), la dose de NP reçue par les macrophages alvéolaires (pour un nombre total d'un million de macrophages) était estimée à 270 ng (Oberdorster and Yu 1999). A titre de comparaison, et avec une concentration de 50 µg/ml, le même nombre de macrophages reçoit 50 µg de NP, soit plus de 180 fois plus. Cependant, une étude beaucoup plus récente et basée sur un modèle dosimétrique des particules largement utilisé et bien accepté, a conclu que la dose alvéolaire de NP inhalées par un homme au cours d'une vie entière d'exposition aux NP (45 années d'exposition à une concentration de 1 mg/m³) correspondait à une concentration *in vitro* de 50 à 68 µg/ml (Gangwal et al. 2011). Il semble toutefois qu'une extrapolation entre une exposition chronique sur toute une vie et une exposition unique et aiguë dans un système *in vitro* ne soit pas vraiment réaliste. C'est pourquoi, les auteurs ont également extrapolé la dose pulmonaire reçue après une inhalation de 24 h de NP à 1 mg/m³ à une concentration *in vitro* de 0,1 à 0,5 µg/ml. Dans une revue de la littérature parue en 2012, Oberdorster préconise d'ailleurs, pour les tests *in vitro*, l'utilisation d'une large gamme de doses, de 0,1 µg/ml à 50 µg/ml (correspondant à des expositions

aiguës et chroniques à long terme, respectivement) pour avoir une vision plus réaliste des conditions réelles d'exposition par voie pulmonaire (Oberdorster 2012).

Ainsi, la concentration de 50 µg/ml choisie pour notre étude, bien qu'élevée, nous permettait d'évaluer et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets biologiques des NP de TiO₂ en absence de toxicité. Afin de pouvoir, par la suite, comparer les effets des NP obtenus *in vitro* à ceux obtenus *in vivo* et en vue d'une extrapolation chez l'homme, il serait intéressant d'utiliser une gamme de concentrations plus faibles de NP.

Un des points rendant également difficile le choix de la dose à utiliser *in vitro* est l'absence de consensus au sein de la communauté scientifique sur la meilleure métrique pour évaluer la dose de NP administrée *in vitro*. En général, afin de définir la dose d'exposition aux NP *in vitro*, la plupart des études toxicologiques menées à ce jour utilisent la masse des particules rapportée au volume de milieu de culture (µg/ml par exemple) ou bien rapportée à la surface d'occupation cellulaire (en µg/cm²). D'autres articles expriment la dose d'exposition en prenant en compte le nombre de NP administrées ou encore la surface spécifique (Braakhuis et al. 2014). Cependant, le choix de la métrique à utiliser est toujours très controversé, et actuellement, nous ignorons toujours quelle est la métrique la plus pertinente pour évaluer les effets des NP sur la santé. Dans cette étude, nous avons donc choisi d'exprimer la dose de NP en µg/ml, métrique traditionnellement utilisée dans les études toxicologiques. Toutefois, il serait également intéressant d'analyser et de comparer les résultats obtenus en prenant en compte la surface spécifique.

5.1.5. Caractérisation de l'autophagie

Un des points critiques dans l'étude du processus autophagique en général, mais surtout dans l'étude des effets des NP sur l'activité autophagique, est le manque d'expériences sur l'activité autophagique, conduisant à une mauvaise interprétation des résultats (Cohignac et al. 2014). En effet, l'autophagie est un processus très dynamique se déroulant en plusieurs étapes. Ce processus peut être régulé tout au long de ces étapes, que ce soit de façon positive ou négative. Une accumulation d'autophagosomes, observée par microscopie électronique ou mesurée par une augmentation de la protéine LC3-II par Western-Blot, peut, par exemple, rendre compte d'une induction de l'autophagie mais aussi d'une diminution du turnover autophagique. C'est pourquoi il est essentiel de distinguer l'induction de l'autophagie du

blocage de l'autophagie résultant tous deux en un phénotype similaire (accumulation d'autophagosomes) mais ayant des origines biologiques totalement différentes. En 2012, *Klionsky et al* ont publié des lignes directrices pour l'évaluation et l'interprétation des expériences pour l'analyse de l'autophagie (Klionsky et al. 2012). Les auteurs recommandent l'utilisation de plusieurs techniques différentes, et notamment des mesures du flux autophagique, pour une bonne interprétation des résultats. C'est pourquoi dans notre travail, plusieurs techniques ont été réalisées pour mesurer le flux autophagique et ainsi conclure sur l'efficacité du processus autophagique en réponse aux NP. De plus, nous avons analysé chaque étape de l'autophagie : de l'initiation du processus, en passant par la fusion entre le lysosome et l'autophagosome, jusqu'à l'évaluation de la fonctionnalité du lysosome. Cela nous a permis d'avoir une vision globale et relativement complète des effets des NP sur le processus autophagique.

5.2. Discussion des résultats

5.2.1. Effets des NP sur l'autophagie

5.2.1.1. Internalisation des particules dans des structures autophagiques

Nous avons montré dans cette étude que toutes les particules utilisées pouvaient être internalisées dans les macrophages RAW264.7. Ces particules sont notamment retrouvées dans des vacuoles autophagiques ou de dégradation (comprenant des autophagosomes, des amphisomes ou des autolysosomes). Ces données basées sur des observations en microscopie électronique suggèrent donc que ces particules seraient prises en charge par la voie autophagique. Dans la littérature, plusieurs études indiquent en effet une internalisation de NP de composition chimique variées (Ag, Au, oxydes de graphène...), soit dans des lysosomes, soit de façon plus large dans des structures autophagiques, après endocytose (Chen et al. 2012; Ma et al. 2011; Tsai et al. 2012; Verma et al. 2012). Des NP de TiO₂ mais aussi des MWCNT carboxylés et non carboxylés ont été retrouvés dans des structures autophagiques après exposition cellulaire pendant 24 heures (Halamoda Kenzaoui et al. 2012; Orecna et al. 2014).

De façon intéressante, dans notre étude, les particules de taille micrométrique (Micro) ne sont pas retrouvées dans des structures contenant des organites et/ou du cytosol, caractéristiques des vacuoles autophagiques (Klionsky et al. 2012), mais plutôt dans des vacuoles vides. Ces observations suggèrent que ces particules pourraient être internalisées via une voie différente de celles empruntées par les autres particules de taille nanométrique. Les propriétés de surface, mais aussi la taille, la forme ou encore la charge de la particule ont en effet été démontrées comme pouvant avoir un impact sur leur internalisation cellulaire (Ma et al. 2013). Dans notre travail, les particules sont principalement retrouvées à l'intérieur de structures autophagiques, nous avons cependant retrouvé des particules dans le cytosol mais aucune à l'intérieur du noyau ou des mitochondries. Nous n'avons cependant pas pu identifier de façon plus précise la/les voie(s) d'internalisation empruntée(s) par nos particules. Il serait intéressant d'étudier ce sujet plus amplement afin de le mettre en exergue avec les effets cellulaires observés.

5.2.1.2. Effet des particules sur le flux autophagique

Après avoir observé une co-localisation entre les structures autophagiques et nos particules, nous avons montré que celles-ci pouvaient modifier le flux autophagique de façon différente selon leur forme. Nos résultats ont montré une accumulation d'autophagosomes en réponse à toutes les particules. Cette accumulation d'autophagosome était la conséquence d'un blocage du flux autophagique par les CNT, mais était associée à un flux fonctionnel pour FW2 et les NP de TiO₂. Ici, le facteur forme semble être le principal facteur déterminant l'effet de la NP sur l'autophagie. En effet, la particule carbonée et sphérique (FW2) induit le même type de réponse que les NP de TiO₂ (flux fonctionnel), suggérant ainsi une absence d'effet de la composition chimique. De plus, même si la particule de TiO₂ Rut est de forme allongée, ses proportions (5 nm de diamètre et 20 nm de longueur) ne sont pas du tout comparables à celles des CNT (25 nm de diamètre et longueur > 1,5 µm) et font qu'elle s'assimile finalement plus à une particule sphérique qu'à un nanotube.

A l'heure actuelle, et bien que d'autres études se soient intéressées aux effets des NP sur l'autophagie, il n'existe aucun consensus quant au type d'effets observés, et ce d'autant plus que peu d'études ont évalué les effets des caractéristiques physico-chimiques des NP sur l'autophagie au sein de la même étude. Les études trouvées dans la littérature montrent des effets similaires à ceux des particules utilisées ici. Orecna et al ont en effet rapporté que des cellules HUVEC exposées à des MWCNT carboxylés présentaient une augmentation de l'expression de LC3-II, sans augmentation supplémentaire en présence de Baf A1, associée à une augmentation d'expression de p62 (Orecna et al. 2014). Dans cette étude, l'accumulation d'autophagosomes était ainsi attribuée à un blocage du flux autophagique. De même, il a été montré que des MWCNT non fonctionnalisés étaient capables de bloquer le flux autophagique dans des poumons de souris exposées (Yu et al. 2013a). Des résultats similaires ont également été démontrés pour des macrophages murins péritonéaux exposés à des SWCNT carboxylés (Wan et al. 2013). Par ailleurs, et de façon cohérente avec nos résultats, Yu et al ont montré une activation de l'autophagie avec un flux fonctionnel en réponse à des NP de TiO₂ dans des cellules de glioblastome humain (Yu and Li 2011). Néanmoins, il existe aussi des études montrant des résultats opposés. Ainsi, il a été montré que des SWCNT carboxylés n'avaient aucun effet sur l'autophagie dans des cellules gliales de souris sauvages mais permettaient au contraire de lever le blocage de l'autophagie induit dans des cellules gliales issues d'un modèle de souris souffrant de la maladie d'Alzheimer (Xue et al. 2014). De

plus, Yu et al ont rapporté que des NP de TiO₂ pouvaient bloquer le flux autophagique *in vitro* dans des cellules épithéliales bronchiques humaines, mais aussi *in vivo* dans des poumons de souris exposées (Yu et al. 2015a; Yu et al. 2015b).

De façon intéressante, quelques-unes de ces études ont montré des effets différents des NP sur l'autophagie en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ainsi, l'étude d'Orecna et al a démontré un blocage du flux autophagique par des MWCNT fonctionnalisés, mais n'a démontré aucun effet sur l'autophagie des MWCNT non fonctionnalisés, suggérant une influence de la fonctionnalisation des CNT sur leurs effets sur le processus autophagique (Orecna et al. 2014). De même, Yu et al ont également observé des effets différents selon la présence ou non d'une fonctionnalisation des MWCNT : les MWCNT non fonctionnalisés étaient capables de bloquer le flux autophagique tandis que les MWCNT non fonctionnalisés n'avaient aucun effet sur ce processus (Yu et al. 2013a). Ici aussi, la fonctionnalisation des MWCNT semble influencer leur réponse autophagique. Il est toutefois important de noter que dans cette dernière étude, la méthode de fonctionnalisation acide des MWCNT a fait varier de façon importante la longueur des MWCNT, les MWCNT fonctionnalisés étant beaucoup plus longs que les non fonctionnalisés (567,4 nm de longueur vs 7,71 nm de longueur, respectivement). Il est ainsi difficile de statuer dans ce cas sur le paramètre influant la réponse autophagique des MWCNT. Contrairement à ces études, nous n'avons pas observé d'influence de la fonctionnalisation, ni de la longueur des MWCNT sur leur effet sur le flux autophagique. De même, nous n'avons observé aucune influence majeure de la composition chimique, de la taille, de la structure cristalline ou encore de la chimie de surface des NP de TiO₂ sur le flux autophagique, toutes les particules sphériques induisant un flux fonctionnel de l'autophagie. Contrairement aux résultats obtenus dans notre étude, l'influence de la composition chimique sur la réponse autophagique a été montrée dans la littérature, dans l'étude de Yu et al, où seuls des NP de TiO₂ induisaient une accumulation d'autophagosomes associée à un flux autophagique fonctionnel ; des NP de Zn et de Fe n'avaient aucun effet sur l'autophagie (Yu and Li 2011). A notre connaissance, aucune étude n'a pour le moment comparé l'effet de nanomatériaux présentant différentes formes sur l'autophagie.

5.2.1.3. Effet des particules sur la formation et l'élongation des autophagosomes

Afin de caractériser de façon plus précise les effets de nos particules sur l'autophagie, nous nous sommes intéressés aux étapes précoces de l'autophagie, c'est-à-dire au déclenchement du processus permettant la formation puis l'élongation du phagophore. L'initiation de l'autophagie conduisant à la formation de l'autophagosome est sous le contrôle de plusieurs complexes : le complexe mTORC1, qui régule négativement l'autophagie et le complexe PI3K de classe III/beclin 1 le régulant de façon positive. De plus, la formation de la membrane autophagosomale nécessite également l'intervention de systèmes de conjugaison, notamment composés des protéines Atg. Dans notre étude, une augmentation de l'activité de mTORC1 est observée en réponse aux CNT mais n'est pas observée avec les autres particules. Cela suggère une inhibition de l'initiation de l'autophagie via mTORC1 par les CNT. Cependant, l'expression de la protéine PTEN, régulant négativement la voie Akt/mTOR n'est pas modifiée suite à l'exposition aux particules. De plus, nos résultats n'indiquent pas de modification d'expression de beclin 1, du conjugué Atg5-Atg12 ni de modification de l'expression génique de Atg4 que ce soit suite à l'exposition aux CNT ou aux autres particules.

Ces données suggèrent donc que la formation des autophagosomes observée en réponse aux particules sphériques serait indépendante des complexes régulateurs de l'autophagie mTORC1 et PI3K de classe III/beclin 1. En effet, chacune des étapes conduisant à la formation des autophagosomes dans l'autophagie classique, dite canonique, nécessite l'activité de plusieurs complexes protéiques (mTORC1, PI3K de classe III/beclin 1 et les protéines Atg). Cependant, de nombreuses études ont fourni la preuve que la formation d'autophagosomes fonctionnels peut contourner certaines de ces étapes et résulter de voies alternatives (autophagie non canonique) (Codogno et al. 2012). Plusieurs formes d'autophagie non-canoniques ont été à ce jour identifiées : celles contournant les protéines impliquées dans l'élongation et la fermeture de l'autophagosome (notamment Atg7, Atg5 et LC3), et celles contournant les protéines importantes pour l'initiation (complexes mTOR et ULK1) et la nucléation (complexe PI3K de classe II/beclin 1) (Codogno et al. 2012). Même si nous ne sommes pas allés plus loin dans la caractérisation de ce phénomène, nos résultats concernant la probable induction d'une autophagie non canonique en réponse à des NP sont intéressants car jusqu'à maintenant, les quelques études publiées sur le sujet montraient une formation des

autophagosomes dépendante de la voie Akt/mTOR ou du complexe beclin 1. En effet, Xue et ses collègues ont montré une diminution de la phosphorylation de mTOR, de p70S6K (une des protéines cibles de mTOR), et d'ULK1 après traitement par des SWCNT carboxylés de cellules gliales issues d'un modèle de souris atteintes de la maladie d'Alzheimer. Cette diminution était accompagnée d'une augmentation de la formation d'autophagosomes avec un flux autophagique fonctionnel, suggérant bien l'implication de la voie mTOR dans l'induction de l'autophagie (Xue et al. 2014). De plus, l'étude de Yu et al a montré une augmentation de l'expression de beclin 1 associée à la formation d'autophagosomes en réponse à des NP de TiO₂ dans des cellules épithéliales bronchiques humaines (Yu and Li 2011). Par ailleurs, une étude récente a montré que des NP d'oxydes de fer induisaient la formation d'autophagosomes via la modulation du complexe beclin 1/Bcl-2/Atg14/Vps34 mais indépendamment de la voie mTOR (Shi et al. 2015). Ces différentes études suggèrent des effets différents des NP sur l'initiation de l'autophagie, celle-ci pouvant être induite de façon classique ou par des voies alternatives. De plus amples études sont nécessaires afin d'identifier les différents mécanismes sous-jacents aux réponses observées avec nos particules d'intérêt.

Bien que nous ayons observé une accumulation d'autophagosomes dans les macrophages traités par les MWCNT, nous avons observé de manière surprenante une activation de la voie mTORC1. Cela pourrait être lié à l'inhibition de la fonction lysosomale que nous avons observé en réponse aux CNT. En effet, il a récemment été montré que l'inhibition pharmacologique de l'activité des lysosomes pouvait activer la voie de signalisation mTORC1, indépendamment du processus autophagique (Newton et al. 2015).

5.2.1.4. Effet des particules sur la fusion autophagosome/lysosome et sur la fonction lysosomale

Nos résultats montrent un blocage du flux autophagique suite à l'exposition aux CNT ; celui-ci n'est pas observé dans les macrophages traités par FW2 et par les particules de TiO₂. Ce blocage pourrait être dû à un blocage du transport des autophagosomes vers les lysosomes, à une absence de fusion entre ces structures ou encore à une dysfonction des lysosomes ne permettant pas la dégradation des composants contenus dans l'autophagosome.

Nous nous sommes en premier lieu intéressés à l'étape de fusion entre l'autophagosome et le lysosome. De plus en plus d'études ont révélé l'importance du cytosquelette dans cette étape (Monastyrska et al. 2009). Le cytosquelette est un réseau cellulaire très dynamique qui supporte la forme de la cellule, régule le trafic intracellulaire, et a un rôle important dans l'autophagie. Dans des hépatocytes de rat, la perturbation des microtubules ou des filaments d'actine par des agents comme le nocodazole, la vinblastine ou la cytochalasine B ou D résulte en l'accumulation de vacuoles autophagiques, reflétant une inhibition du flux autophagique (Aplin et al. 1992; Seglen et al. 1996). Plus récemment, des études ont montré qu'une fois formés, les autophagosomes avancent le long des microtubules pour se concentrer au niveau périnucléaire, à proximité des MTOC, où la majorité des lysosomes se trouvent, pour fusionner avec ces derniers (Jahreiss et al. 2008; Kochl et al. 2006). Dans la littérature, des perturbations du cytosquelette par les NP ont été rapportées. Plusieurs études ont en effet prouvé que les NP, incluant des SWCNT et des NP de TiO_2 , pouvaient interagir directement avec les microtubules ou les filaments d'actine et perturber ainsi leur polymérisation (Choudhury et al. 2013; Gheshlaghi et al. 2008; Ratnikova et al. 2011; Shams et al. 2014). De plus, une exposition à des NP d'oxydes de fer sur des cellules endothéliales humaines conduit à une perturbation des structures du cytosquelette, avec une diminution de l'expression de la vinculine (protéine du cytosquelette permettant la liaison entre les intégrines et le cytosquelette d'actine), et une désorganisation des réseaux d'actine et de tubuline (Wu et al. 2010). De façon intéressante, cette étude suggérait également un dysfonctionnement de l'autophagie comme pouvant expliquer les effets toxiques des NP. Des effets similaires sur le cytosquelette ont été rapportés dans une autre étude étudiant l'exposition de cellules endothéliales humaines et de cellules neurales murines à des NP d'oxydes de fer (Soenen et al. 2010). En outre, des chercheurs ont montré que des cellules tubulaires rénales traitées au fullerèneol présentaient une perturbation des filaments d'actine associée à une accumulation de vacuoles autophagiques (Johnson-Lyles et al. 2010). Les auteurs suggèrent que la perturbation du cytosquelette, en interférant avec la machinerie autophagique, pourrait être un mécanisme expliquant la cytotoxicité du fullerèneol. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de modification au niveau de la structure du cytosquelette, que ce soit en analysant le réseau de microtubules ou celui de filaments d'actine, et ce, quelle que soit la particule utilisée. Ces résultats suggèrent que le transport des autophagosomes vers les lysosomes par le cytosquelette ne serait pas affecté par les NP.

Afin de statuer sur l'efficacité de l'étape de fusion autophagosome-lysosome, nous avons analysé l'expression de gènes (Stx17, SNAP29 et Vamp8) codant pour des protéines de la famille des SNARE, impliquées dans les processus de fusion membranaire. Stx17 est localisée sur la membrane externe de l'autophagosome complet et interagit avec SNAP29 (protéine cytosolique) et Vamp8 (protéine lysosomale) afin de permettre la fusion autophagosome-lysosome (Itakura et al. 2012). Nous n'observons pas de modifications majeures de l'expression génique de Vamp8. Par contre, une diminution significative de l'expression de Stx17 est observée en réponse aux CNT non fonctionnalisés. Celle-ci est associée à une augmentation de l'expression du gène de SNAP29. Ces effets ne sont pas observés suite à l'exposition aux autres particules. Ces résultats suggèrent un potentiel défaut de l'étape de fusion en réponse aux CNT, notamment en réponse à S-CNT et L-CNT. Cependant, ces résultats ne se basant que sur l'expression des gènes, ils devront être validés au niveau protéique.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la fonction des lysosomes ; nous avons cherché à déterminer si ceux-ci étaient fonctionnels ou non suite à l'exposition aux NP. En effet, plusieurs types de nanomatériaux ont été reconnus comme associés à une perturbation lysosomale, pouvant conduire à un dysfonctionnement du processus autophagique (Stern et al. 2012). Par exemple, des MWCNT avec un diamètre inférieur à 8 nm peuvent induire une déstabilisation de la membrane lysosomale dans des fibroblastes 3T3, conduisant au relargage du contenu lysosomal dans le cytoplasme, associé à une augmentation de la production de ROS (Sohaebuddin et al. 2010). De plus, ces mêmes effets ont été décrits dans des cellules épithéliales bronchiques humaines et dans des macrophages alvéolaires murins traités par des NP de TiO₂ (Hamilton et al. 2009; Hussain et al. 2010). Dans notre étude, les résultats indiquent que dans les cellules exposées aux CNT, l'expression des protéines LAMP est augmentée, sans modulation de leur expression génique, suggérant ainsi une augmentation (en nombre ou en taille) des lysosomes. Ceci n'est pas observé dans les macrophages traités par les autres particules, confirmant l'effet distinct des CNT sur le processus autophagique. Bien que nous ayons observé une légère augmentation de l'expression protéique de la cathepsine B en réponse aux CNT, aucune modulation de l'expression de la cathepsine D ou de l'activité des cathepsines totales n'a été observée en réponse aux particules. De plus, l'expression génique de TFEB, un facteur de transcription activant la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse lysosomale, est significativement diminuée suite à l'exposition aux CNT non fonctionnalisés, suggérant un possible défaut de la biogenèse lysosomale en réponse à ces

CNT. Cependant, l'expression génique de TFEB ne corrélant pas toujours avec son activité, il serait intéressant d'analyser son expression protéique et notamment sa phosphorylation pour confirmer ces effets observés concernant la biogenèse lysosomale. L'ensemble de ces résultats sur la fonction lysosomale suggère un dysfonctionnement des lysosomes en réponse aux CNT, notamment aux CNT non fonctionnalisés.

Cette perturbation des lysosomes pourrait expliquer, au moins en partie, le blocage du flux autophagique induit par les CNT. En effet, des lysosomes fonctionnels sont nécessaires pour l'étape de dégradation mais sont aussi nécessaires pour permettre leur fusion avec les autophagosomes. Ce fait a été illustré dans plusieurs études utilisant la bafilomycine A1 : bien qu'à l'origine, cette molécule ait été décrite comme inhibant la fusion autophagosome-lysosome, il est apparu que son effet sur la fusion était principalement dû à son action inhibitrice de l'acidification des lysosomes (Mizushima et al. 2010). De plus, une étude récente, comparant les effets de MWCNT et de NP d'oxydes de terre rare, a montré que ces dernières étaient capables d'inhiber l'acidification des lysosomes mais aussi de perturber l'état de phosphorylation des protéines composant les lysosomes (Li et al. 2014). Ces dysfonctionnements des lysosomes sont associés à une inhibition de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, conduisant à un blocage du flux autophagique. Ce blocage de l'autophagie est associé à une diminution de la dégradation des inflammasomes et ainsi à une production subséquente d'IL-1 β . Dans l'ensemble, notre étude suggère que les CNT, notamment les non fonctionnalisés, pourraient perturber le fonctionnement des lysosomes, probablement via une interaction directe des CNT avec les lysosomes, comme cela a été récemment montré dans notre équipe (Bussy et al. 2013b). Cet effet serait probablement associé à une mauvaise fusion des autophagosomes avec les lysosomes, causant ainsi un blocage du flux autophagique. Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ces effets et de façon à les mettre en lien, de plus amples études sont encore nécessaires.

5.2.2. Effets des particules sur le stress oxydant et l'inflammation

L'induction d'un stress oxydant et le développement d'une réponse inflammatoire sont les mécanismes les plus largement décrits dans la littérature, après exposition *in vitro* et *in vivo* à différents types de NP. Dans le but de déterminer le rôle de l'autophagie dans les effets

observés à la suite d'une exposition aux NP, nous avons commencé à évaluer et à caractériser ces réponses.

Nous avons en premier lieu vérifié que nos particules n'étaient pas contaminées par des endotoxines. En effet, une contamination par des endotoxines peut survenir pendant les étapes de fabrication des NP et celles-ci peuvent induire des effets toxiques qui pourraient être interprétés comme une réponse aux NP (Smulders et al. 2012). Dans notre étude, nous n'avons détecté aucune contamination avec des endotoxines de nos particules. De plus, nous avons également évalué la production de ROS *per se* par les particules. En effet, il est désormais connu que certaines NP peuvent générer par elles-mêmes des ROS, en dehors de tout contexte cellulaire (Crouzier et al. 2010; Nymark et al. 2014). Cette production de ROS pouvant jouer un rôle dans leur réponse pathogénique, et notamment dans l'induction d'un stress oxydant, il est important de l'évaluer. Les nanotubes de carbone S-CNT, L-CNT et LF-CNT sont les particules produisant le plus de ROS en conditions acellulaires alors que SF-CNT, FW2 et Rut n'en produisent pas. Il semble donc que la capacité des particules à générer des ROS dépende du type de particule.

Concernant la réponse oxydante des NP dans les macrophages, nous avons montré une plus forte induction de l'expression de HO-1 par les CNT que par les autres particules. D'une manière générale, il semble que les CNT interagissent plus avec le système anti-oxydant que FW2, Micro et les NP de TiO₂. En effet, ces dernières n'induisent pas d'augmentation d'expression génique d'HO-1, SOD-1 et SOD-2 mais induisent une légère augmentation de l'expression de la protéine HO-1 ; les CNT induisent au contraire une forte augmentation d'HO-1 et de SOD-2, enzymes dont la transcription est induite en réponse à un stress oxydant. Nous avons observé des résultats similaires concernant la réponse inflammatoire. En effet, les CNT induisent une augmentation de l'expression génique de plusieurs cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MCP-1) plus élevée que les autres particules. Cette plus forte augmentation après exposition aux CNT est également retrouvée au niveau protéique (TNF- α et MIP-2). Nous avons observé plusieurs niveaux de réponses oxydantes et inflammatoires à l'intérieur de chaque groupe de particules utilisées (CNT *vs* particules sphériques). En effet, nous avons noté des différences concernant les CNT, SF-CNT étant le moins réactif des CNT. Concernant les particules sphériques, les NP de TiO₂ induisent une réponse inflammatoire plus importante que FW2 ou Micro. De plus le greffage de NP d'or sur P25 conduit à une réponse inflammatoire moins importante que celle observée après exposition à la NP P25 nue.

Les données de la littérature fournissent de multiples preuves de l'influence des caractéristiques physico-chimiques des NP sur les réponses oxydantes et inflammatoires. Ainsi, et de façon cohérente avec ce que nous avons montré, de nombreuses études font état d'une induction d'une inflammation sévère au niveau pulmonaire après exposition à des MWCNT, ce fait s'expliquant probablement par leur forme (Ma-Hock et al. 2013; Ma-Hock et al. 2009; Porter et al. 2013). En effet, une de ces études a montré que des MWCNT induisaient une réponse inflammatoire beaucoup plus importante un jour après exposition pulmonaire chez la souris qu'une masse égale de NP de noir de carbone sphérique. Dans notre étude, les MWCNT sont les plus réactifs, et plus notamment plus réactif que FW2, particule également carbonnée mais de forme sphérique. Cela suggère que la forme intervient en premier plan dans l'induction des réponses oxydantes et inflammatoires. Il serait intéressant, pour confirmer ce résultat, d'évaluer également l'effet de nanotubes de TiO₂. La longueur et/ou la fonctionnalisation des MWCNT semblent également intervenir dans les réponses des macrophages aux CNT. En effet, nous avons observé que SF-CNT induisait des réponses inflammatoires et oxydantes moins importantes que les autres CNT. Plusieurs études comparant des MWCNT de différentes longueurs n'ont pas montré d'influence majeure de la longueur sur la production de cytokines inflammatoires et/ou de ROS (Thurnherr et al. 2011; van Berlo et al. 2014). Cependant, une étude parue en 2012 a montré que des MWCNT courts (4,8 µm) et oxydés entraînaient une réponse oxydante et inflammatoire plus importante que des MWCNT plus longs (9,5 µm) et purifiés (Bussy et al. 2012). Nos résultats suggèrent une influence de composition chimique et de la taille dans les réponses observées suite à l'exposition aux NP, FW2 et Micro induisant des réponses moins importantes que les NP de TiO₂. L'influence de la taille dans la toxicité des NP a été démontrée de nombreuses fois dans la littérature, quel que soit le type de NP utilisée (Braakhuis et al. 2014; Shi et al. 2013). De plus, une revue analysant une grande partie des études toxicologiques, *in vitro* et *in vivo*, conduites sur différents types de NP a montré que les NP de TiO₂ étaient plus toxiques (induisant notamment une inflammation) que les NP de noir de carbone sphériques (Landsiedel et al. 2010a). De façon cohérente avec les résultats obtenus dans notre étude, cette étude comparative conclut sur le degré de toxicité de différentes NP en montrant que les MWCNT induisent plus d'effets que les NP de TiO₂, qui elles induisent plus d'effets que les NP de noir de carbone. Nous avons observé que l'ajout de NP d'or à la surface de NP de TiO₂ pouvait influencer sur leurs effets biologiques. Dans notre étude, cette modification semble diminuer la réponse inflammatoire. Dans la littérature, il a également été montré un effet des modifications de la surface des NP sur leur toxicité, cependant celui-ci dépend fortement du

type de modification effectuée à la surface de la NP (Braakhuis et al. 2014; Shvedova et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats suggère un effet prépondérant de la forme (CNT *vs* particules sphériques) sur les réponses oxydantes et inflammatoires. De plus, la composition chimique, la taille et la chimie de surface semblent également jouer un rôle, de second plan toutefois, dans l'induction de ces réponses.

5.2.3. Lien entre autophagie, stress oxydant et inflammation

L'objectif ces travaux était de comprendre l'effet des NP sur le processus autophagique, mais aussi sur les réponses oxydantes et inflammatoires des macrophages, tout en analysant l'impact de leurs propriétés physico-chimiques sur ces effets. Les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse sont :

- les nanomatériaux utilisés peuvent moduler l'autophagie, avec des effets qui diffèrent principalement en fonction de leur forme : les MWCNT bloquent l'autophagie tandis que les particules sphériques induisent une autophagie fonctionnelle.
- les MWCNT entraînent une réponse oxydante et inflammatoire plus importante que les particules sphériques.

Ces résultats suggèrent un rôle prépondérant de la forme des nanomatériaux sur l'autophagie, mais aussi sur les autres effets biologiques observés ici. Le blocage de l'autophagie par les MWCNT pourrait être lié à leurs importantes réponses oxydantes et inflammatoires. De même, l'induction d'une autophagie fonctionnelle par les particules sphériques pourrait expliquer, du moins en partie, la plus faible réponse inflammatoire observée en réponse à ces NP comparée aux MWCNT. Cependant, les données recueillies ici ne permettent pas de dire si l'effet des NP sur l'autophagie est une cause ou une conséquence de ces réponses pathogéniques. De plus, nos données ne sont que factuelles et nous ne pouvons conclure quant à l'existence de cette relation entre effets des NP sur l'autophagie et effet des NP sur l'inflammation et les stress oxydant. Le lien entre ces différents mécanismes reste donc à démontrer. Cela est d'autant plus vrai que toutes les différences observées entre les particules concernant les réponses oxydantes et inflammatoires ne sont pas observées sur l'autophagie. En effet, bien que nous ayons noté un probable impact de la longueur et de la

fonctionnalisation des MWCNT sur le stress oxydant et l'inflammation, nous avons observé peu de différences avec ces particules sur l'autophagie. Il semble en effet que l'effet observé des MWCNT sur l'autophagie soit commun à tous les MWCNT, indépendamment de leur longueur et de leur chimie de surface. De même, et bien que nous ayons observé un possible effet des propriétés de surface sur la réponse inflammatoire (P25 *vs* P25-Au₃ et P25-Au₆), celle-ci n'est pas retrouvée au niveau de l'autophagie.

En conclusion, un mécanisme possible et hypothétique de toxicité des NP serait qu'elles sont internalisées dans les macrophages par endocytose, pour aboutir dans des vacuoles autophagiques ou lysosomales. En fonction de leur forme (tube *vs* sphériques), ces NP entraîneraient ou non un blocage de l'autophagie dont le mécanisme reste encore à déterminer (probablement dû à une mauvaise fusion induite par un dysfonctionnement lysosomal). Ce blocage de l'autophagie induirait alors une dérégulation de la balance oxydante et inflammatoire cellulaire et serait alors responsable de l'induction du stress oxydant et de l'inflammation.

CHAPITRE 6

6. Conclusions et perspectives

Le but de cette thèse était de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux effets des NP, en s'intéressant tout particulièrement aux effets des NP sur l'autophagie et à l'impact des caractéristiques physico-chimiques des NP dans ces effets. Pour cela, une étude *in vitro* a été réalisée sur une lignée cellulaire de macrophages murins en évaluant la réponse autophagique, oxydante et inflammatoire après exposition à des NP présentant différentes caractéristiques physico-chimiques.

Dans cette thèse, nous avons mis en évidence un rôle des caractéristiques physico-chimique dans la réponse autophagique des macrophages murins exposés à des NP. En effet, nos résultats montrent que les nanomatériaux peuvent conduire à une accumulation d'autophagosomes, avec néanmoins des causes distinctes selon leur forme : les MWCNT bloquent l'autophagie tandis que les particules sphériques induisent une autophagie fonctionnelle. L'accumulation de ces autophagosomes en réponse aux particules sphériques semble être indépendante des voies classiques d'induction de l'autophagie. Cependant, le mécanisme d'induction de la formation des autophagosomes par les NP n'a pas été clairement déterminé ici et il serait donc intéressant, pour compléter cette étude, d'analyser les voies de l'autophagie dite non canonique. Les effets des MWCNT sont accompagnés d'un dysfonctionnement lysosomal et d'un potentiel défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, qui pourraient être à l'origine de ce blocage. Ces résultats méritent d'être approfondis par la suite. Il serait en effet intéressant de regarder si les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes (expérience de co-marquage LC3 et LAMP par exemple), mais aussi d'établir le mécanisme du dysfonctionnement lysosomal induit par les MWCNT, en regardant par exemple, si les pompes H^+ ATPases impliquées dans l'acidification du pH lysosomal sont fonctionnelles. Une perméabilisation de la membrane lysosomale pouvant également expliquer le dysfonctionnement lysosomal observé, l'intégrité de celle-ci pourrait aussi être vérifiée.

Nos résultats indiquent une réactivité plus importante des MWCNT par rapport aux particules sphériques sur la réponse oxydante et inflammatoire. Cette plus forte réactivité pourrait s'expliquer par le blocage de l'autophagie induit par les MWCNT. Cette hypothèse est cependant à vérifier afin de déterminer le rôle de l'autophagie dans les réponses inflammatoires et oxydantes des NP. Ceci pourra être réalisé en évaluant la réponse oxydante et inflammatoire en bloquant complètement l'autophagie (en utilisant des souris déficientes pour l'autophagie par exemple) ou bien, une fois que le mécanisme d'action des MWCNT sur l'autophagie aura été clairement identifié, en restaurant l'autophagie.

Dans l'ensemble, ces travaux nous ont permis d'avoir une meilleure connaissance des effets toxiques des NP, et du rôle de leurs caractéristiques physico-chimiques dans ces effets. Ces résultats apportent de nouvelles informations et ouvrent de nouvelles voies dans l'interprétation et la compréhension de la toxicité des nanomatériaux.

Valorisation de la thèse

Publications

Publication 1 (cf. Annexe 1)

Cohignac V*, Landry MJ*, Boczkowski J, Lanone S.

Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity

Nanomaterials 2014, **4**:548-582.

Publié le 8 juillet 2014

(* co-premiers auteurs)

Publication 2 (cf. Annexe 2)

Suri R, Periselneris J, Lanone S, Zeidler-Erdely PC, Melton G, Palmer KT, Andujar P, Antonini JM, Cohignac V, Erdely A, Jose RJ, Mudway I, Brown J, Grigg J.

Exposure to welding fumes and lower airway infection with *Streptococcus pneumoniae*

The Journal of allergy and clinical immunology 2015, pii: S0091-6749(15)00932-X.

Publié le 12 août 2015

Posters et communications orales

2013	Summer School Nanosciences Ile de France, Le Trembaly- sur-Mauldre	Poster
	CPC - INSERM Summer retreat, Tours	Communication orale
	Journée d'étude du pôle Santé Société, Maisons-Alfort	Poster
	Journée d'avancement du DIM Nano K, Paris	Poster
2014	Journée des Sciences de la Vie, Créteil	Poster
	Journées scientifiques de l'école doctorale ABIES, Paris	Poster
	Colloque ARET-SFTG, Paris	Poster
	Lungstorming, Fontenay-Tresigny	Communication orale
	Meeting doctorants et post-doctorants du Labex Sérénade, Aix-en-Provence	Communication orale
	First Joint Meeting of Nordic, Spanish and French Autophagy Networks, Toulouse	Poster
	Journées de Recherche Respiratoire (J2R), Bordeaux	Poster
	Congrès Nanosafe, Grenoble	Poster
	Journée d'avancement du DIM Nano K, Paris	Poster
2015	Journée DHU A-TVb, Créteil	Poster
	Journée des Sciences de la Vie, Créteil	Poster
	CPC – INSERM Retreat School, Tegernsee, Allemagne	Poster
	Journée d'avancement du DIM Nano K, Paris	Poster
	Journées de Recherche Respiratoire (J2R), Dijon	Poster

Références bibliographiques

- Abdulrahman BA, et al. (2011) Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by *Burkholderia cenocepacia* in a model of cystic fibrosis. *Autophagy* 7(11):1359-70
- Afeseh Ngwa H, Kanthasamy A, Gu Y, Fang N, Anantharam V, Kanthasamy AG (2011) Manganese nanoparticle activates mitochondrial dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells. *Toxicology and applied pharmacology* 256(3):227-40
- Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE (2009) Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews* 61(6):428-37
- Aplin A, Jasionowski T, Tuttle DL, Lenk SE, Dunn WA, Jr. (1992) Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *Journal of cellular physiology* 152(3):458-66
- Armand L, et al. (2013) Titanium dioxide nanoparticles induce matrix metalloprotease 1 in human pulmonary fibroblasts partly via an interleukin-1 β -dependent mechanism. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48(3):354-63
- Austin RH, Lim SF (2008) The Sackler Colloquium on promises and perils in nanotechnology for medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(45):17217-21
- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglian V (2006) Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *The Lancet Oncology* 7(4):295-6
- Baan RA (2007) Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group. *Inhalation toxicology* 19 Suppl 1:213-28
- Baggs RB, Ferin J, Oberdorster G (1997) Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Veterinary pathology* 34(6):592-7
- Baisch BL, et al. (2014) Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Particle and fibre toxicology* 11(1):5
- Bakand S, Winder C, Khalil C, Hayes A (2006) A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *Journal of environmental monitoring* : JEM 8(1):100-5
- Bardag-Gorce F, et al. (2005) Modifications in P62 occur due to proteasome inhibition in alcoholic liver disease. *Life sciences* 77(20):2594-602 doi:10.1016/j.lfs.2005.04.020
- Beddoes CM, Case CP, Briscoe WH (2015) Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in colloid and interface science* 218:48-68
- Behabtu N, Green MJ, Pasquali M (2008) Carbon nanotube-based neat fibers. *Nanotoday* 3(5-6):24-34
- Bennat C, Muller-Goymann CC (2000) Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *International journal of cosmetic science* 22(4):271-83
- Berg TO, Fengsrud M, Stromhaug PE, Berg T, Seglen PO (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem* 273(34):21883-92
- Bergin IL, Witzmann FA (2013) Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. *International journal of biomedical nanoscience and nanotechnology* 3(1-2)

- Bermudez E, et al. (2002) Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 70(1):86-97
- Bermudez E, et al. (2004) Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 77(2):347-57
- Boczkowski J, Lanone S (2012) Respiratory toxicities of nanomaterials -- a focus on carbon nanotubes. *Advanced drug delivery reviews* 64(15):1694-9
- Boffetta P, Gaborieau V, Nadon L, Parent MF, Weiderpass E, Siemiatycki J (2001) Exposure to titanium dioxide and risk of lung cancer in a population-based study from Montreal. *Scandinavian journal of work, environment & health* 27(4):227-32
- Boffetta P, et al. (2004) Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer causes & control : CCC* 15(7):697-706
- Bogdan J, Jackowska-Tracz A, Zarzynska J, Plawinska-Czarnak J (2015) Chances and limitations of nanosized titanium dioxide practical application in view of its physicochemical properties. *Nanoscale research letters* 10:57
- Borm PJ, et al. (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and fibre toxicology* 3:11
- Borm PJ, Schins RP, Albrecht C (2004) Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *International journal of cancer Journal international du cancer* 110(1):3-14
- Braakhuis HM, Park MV, Gosens I, De Jong WH, Cassee FR (2014) Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Particle and fibre toxicology* 11(1):18
- Brun E, et al. (2014) Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Particle and fibre toxicology* 11:13
- Burman C, Ktistakis NT (2010) Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS letters* 584(7):1302-12
- Bussy C, et al. (2013a) Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 10(1):24]
- Bussy C, et al. (2013b) Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: pH-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 10:24
- Bussy C, et al. (2012) Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity. *Particle and fibre toxicology* 9:46
- Buzea C, Pacheco, II, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2(4):MR17-71
- Castro C., Pinault M., Porterat D., Reynaud C., M. M-LH (2013) The role of hydrogen in the aerosol-assisted chemical vapor deposition process in producing thin and densely packed vertically aligned carbon nanotubes. *Carbon* 6(1):585-594
- Chang NC, Nguyen M, Germain M, Shore GC (2010) Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. *The EMBO journal* 29(3):606-18
- Chen GY, et al. (2014a) Graphene Oxide Triggers Toll-Like Receptors/Autophagy Responses In Vitro and Inhibits Tumor Growth In Vivo. *Adv Healthc Mater*
- Chen GY, et al. (2012) Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials* 33(27):6559-69
- Chen HW, et al. (2006) Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J* 20(13):2393-5

- Chen L, Zhang B, Toborek M (2013a) Autophagy is involved in nanoalumina-induced cerebrovascular toxicity. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 9(2):212-21
- Chen T, Hu J, Chen C, Pu J, Cui X, Jia G (2013b) Cardiovascular effects of pulmonary exposure to titanium dioxide nanoparticles in ApoE knockout mice. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 13(5):3214-22
- Chen T, Yan J, Li Y (2014b) Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of food and drug analysis* 22(1):95-104
- Chen X, Mao SS (2007) Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chemical reviews* 107(7):2891-959
- Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009a) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation* 16(7):1040-52
- Chen Y, Yang L, Feng C, Wen LP (2005) Nano neodymium oxide induces massive vacuolization and autophagic cell death in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 337(1):52-60
- Chen YS, Hung YC, Liao I, Huang GS (2009b) Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale research letters* 4(8):858-864
- Chen Z, et al. (2014c) Genotoxic evaluation of titanium dioxide nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology letters* 226(3):314-9
- Chen ZH, et al. (2008) Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PloS one* 3(10):e3316
- Chen ZH, et al. (2010) Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(44):18880-5
- Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters* 6(4):662-8
- Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH, Seok SH (2013) Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration. *Particle and fibre toxicology* 10:9
- Choi AM, Ryter SW, Levine B (2013) Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* 368(7):651-62
- Choi KS (2012) Autophagy and cancer. *Experimental & molecular medicine* 44(2):109-20
- Choudhury D, et al. (2013) Unprecedented inhibition of tubulin polymerization directed by gold nanoparticles inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Nanoscale* 5(10):4476-89
- Churg A, Gilks B, Dai J (1999) Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants. *The American journal of physiology* 277(5 Pt 1):L975-82
- Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2012) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nature reviews Molecular cell biology* 13(1):7-12
- Cohignac V, Landry M, Boczkowski J, Lanone S (2014) Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity. *Nanomaterials* 4:548-582
- Cong Y, Pang C, Dai L, Banta GT, Selck H, Forbes VE (2011) Importance of characterizing nanoparticles before conducting toxicity tests. *Integrated environmental assessment and management* 7(3):502-3
- Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44
- Consortium TWTCC (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447(7145):661-78

- Coppola D, Khalil F, Eschrich SA, Boulware D, Yeatman T, Wang HG (2008) Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 113(10):2665-70
- Crouzier D, et al. (2010) Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology* 272(1-3):39-45
- Czajka M, Sawicki K, Sikorska K, Popek S, Kruszewski M, Kapka-Skrzypczak L (2015) Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 29(5):1042-1052
- Dankovic D, Kuempel E, Wheeler M (2007) An approach to risk assessment for TiO₂. *Inhalation toxicology* 19 Suppl 1:205-12
- Donaldson K, Gilmour PS, Beswick PH (1995) Supercoiled plasmid DNA as a model target for assessing the generation of free radicals at the surface of fibres. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 47(4):235-7
- dos Santos T, Varela J, Lynch I, Salvati A, Dawson KA (2011) Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines. *Small* 7(23):3341-9
- Duan J, et al. (2014a) Silica nanoparticles enhance autophagic activity, disturb endothelial cell homeostasis and impair angiogenesis. *Particle and fibre toxicology* 11:50
- Duan J, et al. (2014b) Silica nanoparticles induce autophagy and endothelial dysfunction via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *International journal of nanomedicine* 9:5131-41
- Eidi H, et al. (2012) Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int J Pharm* 422(1-2):495-503
- Ekstrand-Hammarstrom B, Akfur CM, Andersson PO, Lejon C, Osterlund L, Bucht A (2012) Human primary bronchial epithelial cells respond differently to titanium dioxide nanoparticles than the lung epithelial cell lines A549 and BEAS-2B. *Nanotoxicology* 6(6):623-34
- El-Kirdasy A, Nassan M, Baiomy A, Ismail T, Soliman M, Attia H (2014) Potential ameliorative role of N-acetylcysteine against testicular dysfunction induced by titanium dioxide in male albino rats *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 9(1):29-38
- Elgrabli D, et al. (2007) Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for in vivo and in vitro studies. *Nanotoxicology, Informa Healthcare* 1(4):266-278
- Elo R, Maatta K, Uksila E, Arstila AU (1972) Pulmonary deposits of titanium dioxide in man. *Archives of pathology* 94(5):417-24
- Eydner M, et al. (2012) Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index. *Inhalation toxicology* 24(9):557-69
- Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, Wiench K, Wohlleben W, van Ravenzwaay B (2008) Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archives of toxicology* 82(3):151-7
- Farombi EO (2006) Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. *Cell biology and toxicology* 22(3):159-67
- Fimia GM, et al. (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447(7148):1121-5
- Fisichella M, Berenguer F, Steinmetz G, Auffan M, Rose J, Prat O (2012) Intestinal toxicity evaluation of TiO₂ degraded surface-treated nanoparticles: a combined physico-

- chemical and toxicogenomics approach in caco-2 cells. *Particle and fibre toxicology* 9:18
- Franca A, Aggarwal P, Barsov EV, Kozlov SV, Dobrovolskaia MA, Gonzalez-Fernandez A (2011) Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro. *Nanomedicine (Lond)* 6(7):1175-88
- Frohlich E, Roblegg E (2012) Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology* 291(1-3):10-7
- Frohlich E, Salar-Behzadi S (2014) Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *International journal of molecular sciences* 15(3):4795-822
- Fryzek JP, et al. (2003) A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 45(4):400-9
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* 19(5):2092-100
- Gamer AO, Leibold E, van Ravenzwaay B (2006) The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 20(3):301-7
- Gangwal S, et al. (2011) Informing selection of nanomaterial concentrations for ToxCast in vitro testing based on occupational exposure potential. *Environmental health perspectives* 119(11):1539-46
- Garabrant DH, Fine LJ, Oliver C, Bernstein L, Peters JM (1987) Abnormalities of pulmonary function and pleural disease among titanium metal production workers. *Scandinavian journal of work, environment & health* 13(1):47-51
- Geiser M, Casaulta M, Kupferschmid B, Schulz H, Semmler-Behnke M, Kreyling W (2008) The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38(3):371-6
- Geiser M, Kreyling WG (2010) Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 7:2 doi:10.1186/1743-8977-7-2
- Geiser M, et al. (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental health perspectives* 113(11):1555-60
- Geng J, Nair U, Yasumura-Yorimitsu K, Klionsky DJ (2010) Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 21(13):2257-69
- Gerloff K, et al. (2012) Distinctive toxicity of TiO₂ rutile/anatase mixed phase nanoparticles on Caco-2 cells. *Chemical research in toxicology* 25(3):646-55
- Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R (2008) Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40(9):777-82
- Glory J, Bonetti M, Helezen M, Mayne-L'Hermite M, Reynaud C (2008) Thermal and electrical conductivities of water-based nanofluids prepared with long multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Applied Physics* 103(094309)
- Gong L, Devenish RJ, Prescott M (2012) Autophagy as a macrophage response to bacterial infection. *IUBMB life* 64(9):740-7
- Grassian VH, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, O'Shaughnessy P T, Thorne PS (2007) Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology* 1(3):211-226

- Gratton SE, et al. (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(33):11613-8
- Gulson B, et al. (2010) Small amounts of zinc from zinc oxide particles in sunscreens applied outdoors are absorbed through human skin. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 118(1):140-9
- Gulson B, et al. (2012) Comparison of dermal absorption of zinc from different sunscreen formulations and differing UV exposure based on stable isotope tracing. *The Science of the total environment* 420:313-8
- Guo JY, Xia B, White E (2013) Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* 155(6):1216-9
- Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 213(1-2):66-73
- Gutierrez MG, et al. (2005) Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles. *Cellular microbiology* 7(7):981-93
- Hailey DW, et al. (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141(4):656-67
- Halamoda Kenzaoui B, Chapuis Bernasconi C, Guney-Ayra S, Juillerat-Jeanneret L (2012) Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells. *The Biochemical journal* 441(3):813-21
- Hamilton RF, Wu N, Porter D, Buford M, Wolfarth M, Holian A (2009) Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Particle and fibre toxicology* 6:35
- Hanada T, et al. (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 282(52):37298-302
- Hara T, et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095):885-9
- Harhaji L, et al. (2007) Multiple mechanisms underlying the anticancer action of nanocrystalline fullerene. *Eur J Pharmacol* 568(1-3):89-98
- Harris J, et al. (2011) Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *J Biol Chem* 286(11):9587-97
- Hartley JW, et al. (2008) Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. *Retrovirology* 5:1
- Hashimoto K, Irie H, Fujishima A (2005) TiO₂ Photocatalysis: A Historical Overview and Future Prospects. *Japanese Journal of Applied Physics* 44(12):8269-8285
- Haspel JA, Choi AM (2011) Autophagy: a core cellular process with emerging links to pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184(11):1237-46
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11(12):1433-7
- Henckaerts L, et al. (2011) Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 17(6):1392-7
- Hoet PH, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV (2004) Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journal of nanobiotechnology* 2(1):12
- Houdeau E (2012) Nanoparticules et barrière intestinale : comprendre les mécanismes de franchissement. *nnovations Agronomiques* 24:105-112

- Hu JQ, et al. (2010) [Effect of nano-TiO₂ intratracheal instillation on lipid metabolism of AopE gene-knockout mice]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [Chinese journal of preventive medicine] 44(9):780-4
- Huang KT, et al. (2015) Titanium nanoparticle inhalation induces renal fibrosis in mice via an oxidative stress upregulated transforming growth factor-beta pathway. *Chemical research in toxicology* 28(3):354-64
- Hussain S, et al. (2012) Cerium dioxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human peripheral blood monocytes. *ACS nano* 6(7):5820-9
- Hussain S, et al. (2009a) Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology* 260(1-3):142-9
- Hussain S, et al. (2010) Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology* 7:10
- Hussain S, et al. (2011) Lung exposure to nanoparticles modulates an asthmatic response in a mouse model. *The European respiratory journal* 37(2):299-309
- Hussain SM, et al. (2009b) Toxicity Evaluation for Safe Use of Nanomaterials: Recent Achievements and Technical Challenges. *Advanced Materials* 21(16):1549-1559
- Hwang JW, et al. (2010) Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD. *Archives of biochemistry and biophysics* 500(2):203-9
- International Commission on Radiological Protection. (1994) Human respiratory tract model for radiological protection. A report of a Task Group of the International Commission on Radiological Protection. *Annals of the ICRP* 24(1-3):1-482
- ISO/TR (2012) Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. 13014:2012-05 (E)
- Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151(6):1256-69
- Jager S, et al. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science* 117(Pt 20):4837-48
- Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 9(4):574-87
- Jain A, et al. (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 285(29):22576-91
- Jiang P, Mizushima N (2014) Autophagy and human diseases. *Cell research* 24(1):69-79
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH (2008) Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical research in toxicology* 21(9):1871-7
- Jing X, Park JH, Peters TM, Thorne PS (2015) Toxicity of copper oxide nanoparticles in lung epithelial cells exposed at the air-liquid interface compared with in vivo assessment. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 29(3):502-11
- Johnson-Lyles DN, et al. (2010) Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and applied pharmacology* 248(3):249-58
- Johnston HJ, Hutchison GR, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V (2009) Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Particle and fibre toxicology* 6:33
- Jugan ML, et al. (2012) Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* 6(5):501-13

- Kansara K, et al. (2015) TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environmental and molecular mutagenesis* 56(2):204-17
- Kaushik S, Cuervo AM (2006) Autophagy as a cell-repair mechanism: activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular aspects of medicine* 27(5-6):444-54
- Kettiger H, Schipanski A, Wick P, Huwyler J (2013) Engineered nanomaterial uptake and tissue distribution: from cell to organism. *International journal of nanomedicine* 8:3255-69
- Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SA, Chauhan LK, Ahmad I (2012) Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 33(5):1477-88
- Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular biology of the cell* 15(11):4829-40
- Kim HP, et al. (2008) Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1. *Autophagy* 4(7):887-95
- Kim JA, Aberg C, Salvati A, Dawson KA (2012) Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nature nanotechnology* 7(1):62-8
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell structure and function* 33(1):109-22
- Kirkin V, et al. (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Molecular cell* 33(4):505-16
- Klionsky DJ, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8(4):445-544
- Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J (2009) Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology* 264(1-2):110-8
- Kochl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA (2006) Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7(2):129-45
- Komatsu M, et al. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12(3):213-23
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nature reviews Cancer* 5(9):726-34
- Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schneckeburger J (2012) Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of toxicology* 86(7):1123-36
- Kuempel ED, Tran CL, Castranova V, Bailer AJ (2006) Lung dosimetry and risk assessment of nanoparticles: evaluating and extending current models in rats and humans. *Inhalation toxicology* 18(10):717-24
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* 277(21):18619-25
- Kurian MA, Gissen P, Smith M, Heales S, Jr., Clayton PT (2011) The monoamine neurotransmitter disorders: an expanding range of neurological syndromes. *The Lancet Neurology* 10(8):721-33
- Kurihara Y, et al. (2012) Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem* 287(5):3265-72

- Lam HC, et al. (2013) Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *The Journal of clinical investigation* 123(12):5212-30
- Landsiedel R, et al. (2010a) Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Adv Mater* 22(24):2601-27
- Landsiedel R, et al. (2010b) Gene toxicity studies on titanium dioxide and zinc oxide nanomaterials used for UV-protection in cosmetic formulations. *Nanotoxicology* 4:364-81
- Lanone S, Andujar P, Kermanizadeh A, Boczkowski J (2013) Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced drug delivery reviews* 65(15):2063-9
- Larsen ST, Roursgaard M, Jensen KA, Nielsen GD (2010) Nano titanium dioxide particles promote allergic sensitization and lung inflammation in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 106(2):114-7
- Le Bihan O, et al. (2009) Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome. *Journal of structural biology* 168(3):419-25
- LeBlanc AJ, Cumpston JL, Chen BT, Frazer D, Castranova V, Nurkiewicz TR (2009) Nanoparticle inhalation impairs endothelium-dependent vasodilation in subepicardial arterioles. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 72(24):1576-84
- Lee CM, et al. (2011a) C60 fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the beta-amyloid peptide. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 7(1):107-14
- Lee J, Giordano S, Zhang J (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal* 441(2):523-40
- Lee JA, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao FB (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Current biology : CB* 17(18):1561-7
- Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF (1985) Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO₂) by inhalation for two years. *Toxicology and applied pharmacology* 79(2):179-92
- Lee SJ, et al. (2011b) Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 183(5):649-58
- Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research* 8(1):3-5
- Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1):27-42
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469(7330):323-35
- Li C, et al. (2009) PAMAM nanoparticles promote acute lung injury by inducing autophagic cell death through the Akt-TSC2-mTOR signaling pathway. *J Mol Cell Biol* 1(1):37-45
- Li H, Li Y, Jiao J, Hu HM (2011) Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. *Nature nanotechnology* 6(10):645-50
- Li JJ, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Yung LY (2010a) Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* 31(23):5996-6003
- Li R, et al. (2014) Interference in autophagosome fusion by rare earth nanoparticles disrupts autophagic flux and regulation of an interleukin-1beta producing inflammasome. *ACS nano* 8(10):10280-92

- Li Y, et al. (2010b) Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10(12):8544-9
- Liang C, et al. (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 8(7):688-99
- Liang C, et al. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10(7):776-87
- Liang XH, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402(6762):672-6
- Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Bruning T (2008) Health effects due to endotoxin inhalation (review). *Archives of toxicology* 82(4):203-10
- Lindberg HK, et al. (2012) Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. *Mutation research* 745(1-2):58-64
- Ling J, et al. (2012) KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell* 21(1):105-20
- Liu E, et al. (2009) Pulmonary toxicity induced by three forms of titanium dioxide nanoparticles via intra-tracheal instillation in rats. *Progress in Natural Science* 19(5):573-579
- Liu H, He Z, von Rutte T, Yousefi S, Hunger RE, Simon HU (2013) Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. *Science translational medicine* 5(202):202ra123
- Liu HL, et al. (2011) A functionalized single-walled carbon nanotube-induced autophagic cell death in human lung cells through Akt-TSC2-mTOR signaling. *Cell Death Dis* 2:e159
- Luciani A, et al. (2010) Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat Cell Biol* 12(9):863-75
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38):14265-70
- Lunov O, et al. (2011) Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line. *ACS nano* 5(3):1657-69
- Luo YH, et al. (2013) Cadmium-based quantum dot induced autophagy formation for cell survival via oxidative stress. *Chemical research in toxicology* 26(5):662-73
- Ma-Hock L, et al. (2013) Comparative inhalation toxicity of multi-wall carbon nanotubes, graphene, graphite nanoplatelets and low surface carbon black. *Particle and fibre toxicology* 10:23
- Ma-Hock L, et al. (2009) Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 112(2):468-81
- Ma N, et al. (2013) Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 13(10):6485-98
- Ma X, et al. (2011) Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS nano* 5(11):8629-39
- Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M (2014) Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8(3):233-78
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y (2013) Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed research international* 2013:942916

- Mano SS, Kanehira K, Sonezaki S, Taniguchi A (2012) Effect of polyethylene glycol modification of TiO₂ nanoparticles on cytotoxicity and gene expressions in human cell lines. *International journal of molecular sciences* 13(3):3703-17
- Markovic ZM, et al. (2012) Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials* 33(29):7084-92
- Mathew R, et al. (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137(6):1062-75
- Matsunaga K, et al. (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11(4):385-96
- Mizumura K, Cloonan SM, Haspel JA, Choi AM (2012) The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases. *Chest* 142(5):1289-99
- Mizushima N (2004) Methods for monitoring autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(12):2491-502
- Mizushima N, et al. (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science* 116(Pt 9):1679-88
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182):1069-75
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T (2002) Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function* 27(6):421-9
- Mizushima N, Yoshimori T, Levine B (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140(3):313-26
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011) The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology* 27:107-32
- Mohr U, Ernst H, Roller M, Pott F (2006) Pulmonary tumor types induced in Wistar rats of the so-called "19-dust study". *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 58(1):13-20
- Monastyrska I, Rieter E, Klionsky DJ, Reggiori F (2009) Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 84(3):431-48
- Monick MM, et al. (2010) Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J Immunol* 185(9):5425-35
- Monteiro-Riviere NA, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO, Riviere JE (2011) Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 123(1):264-80
- Moon C, Park HJ, Choi YH, Park EM, Castranova V, Kang JL (2010) Pulmonary inflammation after intraperitoneal administration of ultrafine titanium dioxide (TiO₂) at rest or in lungs primed with lipopolysaccharide. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 73(5):396-409
- Morimoto Y, et al. (2011) Investigation of gene expression of MMP-2 and TIMP-2 mRNA in rat lung in inhaled nickel oxide and titanium dioxide nanoparticles. *Industrial health* 49(3):344-52
- Moscat J, Diaz-Meco MT (2012) p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends in biochemical sciences* 37(6):230-6
- Mu Q, et al. (2014) Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chemical reviews* 114(15):7740-81
- Muller J, et al. (2005) Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and applied pharmacology* 207(3):221-31

- Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, Choi AM, Ryter SW (2014) Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease. *Antioxidants & redox signaling* 20(3):474-94
- Nakahira K, et al. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology* 12(3):222-30
- Nanocare (2008) Preparing suspensions of nanoscale particles for biological testing with phagocytic cells.
- Naya M, et al. (2012) In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP 62(1):1-6
- Nel AE, et al. (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature materials* 8(7):543-57
- Nemoto T, et al. (2003) The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem* 278(41):39517-26
- Newton PT, Vuppapapati KK, Boudierlique T, Chagin AS (2015) Pharmacological inhibition of lysosomes activates the MTORC1 signaling pathway in chondrocytes in an autophagy-independent manner. *Autophagy* 11(9):1594-607
- NIOSH (2011) Occupational Exposure to Titanium Dioxide. Current Intelligence Bulletin 63, Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health
- Noel A, Charbonneau M, Cloutier Y, Tardif R, Truchon G (2013) Rat pulmonary responses to inhaled nano-TiO₂: effect of primary particle size and agglomeration state. *Particle and fibre toxicology* 10:48
- Noel A, et al. (2012) Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicology letters* 214(2):109-19
- Numano T, et al. (2014) Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. *Asian Pacific journal of cancer prevention* : APJCP 15(2):929-35
- Nurkiewicz TR, et al. (2008) Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction. *Particle and fibre toxicology* 5:1
- Nymark P, et al. (2014) Free radical scavenging and formation by multi-walled carbon nanotubes in cell free conditions and in human bronchial epithelial cells. *Particle and fibre toxicology* 11:4
- Oberdorster G (2002) Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhalation toxicology* 14(1):29-56
- Oberdorster G (2010) Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine* 267(1):89-105
- Oberdorster G (2012) Nanotoxicology: in vitro-in vivo dosimetry. *Environmental health perspectives* 120(1):A13; author reply A13
- Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE (1994) Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental health perspectives* 102 Suppl 5:173-9
- Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives* 113(7):823-39
- Oberdorster G, Yu CP (1999) Lung dosimetry--considerations for noninhalation studies. *Experimental lung research* 25(1):1-6
- Oczypok EA, Oury TD, Chu CT (2013) It's a cell-eat-cell world: autophagy and phagocytosis. *The American journal of pathology* 182(3):612-22
- Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603(2):113-28

- Orecna M, et al. (2014) Toxicity of carboxylated carbon nanotubes in endothelial cells is attenuated by stimulation of the autophagic flux with the release of nanomaterial in autophagic vesicles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*
- Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RA, Pernodet N, Rafailovich MH (2009) Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small* 5(4):511-20
- Panas A, et al. (2014) Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein journal of nanotechnology* 5:1590-602
- Pardridge W (1995) Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced drug delivery reviews* 15(1-3):5-36
- Park BC, et al. (2008) Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicology letters* 178(1):52-60
- Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K (2009) Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology* 260(1-3):37-46
- Park J, Choi K, Jeong E, Kwon D, Benveniste EN, Choi C (2004) Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia* 47(1):9-20
- Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, Sesti F (2003) Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem* 278(50):50212-6
- Pattingre S, et al. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122(6):927-39
- Periasamy VS, Athinarayanan J, Al-Hadi AM, Juhaimi FA, Alshatwi AA (2015) Effects of titanium dioxide nanoparticles isolated from confectionery products on the metabolic stress pathway in human lung fibroblast cells. *Archives of environmental contamination and toxicology* 68(3):521-33
- Perlmutt DH (2006) The role of autophagy in alpha-1-antitrypsin deficiency: a specific cellular response in genetic diseases associated with aggregation-prone proteins. *Autophagy* 2(4):258-63
- Porter DW, et al. (2013) Acute pulmonary dose-responses to inhaled multi-walled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 7(7):1179-94
- Qin Y, et al. (2015) Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology* 327:62-76
- Qu X, et al. (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation* 112(12):1809-20
- Rahman M, Laurent S, Tawil N, Yahia L, Mahmoudi M (2013) Protein-Nanoparticle Interactions. *Springer Series in Biophysics* 15
- Rao S, et al. (2014) A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nature communications* 5:3056
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15(1):261-7
- Ratnikova TA, Govindan PN, Salonen E, Ke PC (2011) In vitro polymerization of microtubules with a fullerene derivative. *ACS nano* 5(8):6306-14
- Ravikumar B, et al. (2005) Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nature genetics* 37(7):771-6

- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC (2010a) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12(8):747-57
- Ravikumar B, et al. (2010b) Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 90(4):1383-435
- Reisetter AC, et al. (2011) Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles. *J Biol Chem* 286(24):21844-52
- Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *The Biochemical journal* 377(Pt 1):159-69
- Renna M, et al. (2011) Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *Journal of cell science* 124(Pt 3):469-82 doi:10.1242/jcs.076489
- Roduner E (2006) Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society reviews* 35(7):583-92
- Rossi EM, et al. (2010) Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 113(2):422-33
- Rothen-Rutishauser B, Muhlfeld C, Blank F, Musso C, Gehr P (2007) Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Particle and fibre toxicology* 4:9
- Roulet A, et al. (2012) Intratracheally administered titanium dioxide or carbon black nanoparticles do not aggravate elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *BMC pulmonary medicine* 12:38
- Roy R, Singh SK, Chauhan LK, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD (2014) Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. *Toxicology letters*
- Russell RC, et al. (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15(7):741-50
- Rusten TE, Stenmark H (2009) How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of cell science* 122(Pt 13):2179-83
- Ryter SW, Choi AM (2015) Autophagy in lung disease pathogenesis and therapeutics. *Redox biology* 4:215-25
- Ryter SW, Nakahira K, Haspel JA, Choi AM (2012) Autophagy in pulmonary diseases. *Annual review of physiology* 74:377-401
- Saber AT, et al. (2012) Inflammatory and genotoxic effects of nanoparticles designed for inclusion in paints and lacquers. *Nanotoxicology* 6(5):453-71
- Sadrieh N, et al. (2010) Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 115(1):156-66
- Sager TM, Kommineni C, Castranova V (2008) Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. *Particle and fibre toxicology* 5:17
- Saitoh T, et al. (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456(7219):264-8
- Sala D, et al. (2014) Autophagy-regulating TP53INP2 mediates muscle wasting and is repressed in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 124(5):1914-27
- Sarantis H, Grinstein S (2012) Subversion of phagocytosis for pathogen survival. *Cell host & microbe* 12(4):419-31

- Sato K, et al. (2007) Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer research* 67(20):9677-84
- Saxena RK, Gilmour MI, Hays MD (2008) Isolation and quantitative estimation of diesel exhaust and carbon black particles ingested by lung epithelial cells and alveolar macrophages in vitro. *BioTechniques* 44(6):799-805
- Sayes CM, et al. (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 92(1):174-85
- SCENIHR SCoEaNIHR (2010) Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal* 26(7):1749-60
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140(6):821-32
- Seglen PO, Berg TO, Blankson H, Fengsrud M, Holen I, Stromhaug PE (1996) Structural aspects of autophagy. *Advances in experimental medicine and biology* 389:103-11
- Senzui M, Tamura T, Miura K, Ikarashi Y, Watanabe Y, Fujii M (2010) Study on penetration of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *The Journal of toxicological sciences* 35(1):107-13
- Shams H, et al. (2014) Actin reorganization through dynamic interactions with single-wall carbon nanotubes. *ACS nano* 8(1):188-97
- Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU (2014) Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of nanobiotechnology* 12:5
- Shen HM, Mizushima N (2014) At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends in biochemical sciences* 39(2):61-71
- Shi CS, et al. (2012) Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology* 13(3):255-63
- Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J (2013) Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and fibre toxicology* 10:15
- Shi M, Cheng L, Zhang Z, Liu Z, Mao X (2015) Ferroferric oxide nanoparticles induce prosurvival autophagy in human blood cells by modulating the Beclin 1/Bcl-2/VPS34 complex. *International journal of nanomedicine* 10:207-16
- Shinohara N, et al. (2015) Pulmonary clearance kinetics and extrapulmonary translocation of seven titanium dioxide nano- and submicron materials following intratracheal administration in rats. *Nanotoxicology*:1-9
- Shvedova AA, Kagan VE, Fadeel B (2010) Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nano-cosmos of biological systems. *Annual review of pharmacology and toxicology* 50:63-88
- Singh S, et al. (2007) Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and applied pharmacology* 222(2):141-51
- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S (2011) Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and oncology* 45(4):227-47
- Smulders S, et al. (2012) Contamination of nanoparticles by endotoxin: evaluation of different test methods. *Particle and fibre toxicology* 9:41

- Soenen SJ, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M (2010) High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* 6(7):832-42
- Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L (2010) Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and fibre toxicology* 7:22
- Song MF, Li YS, Kasai H, Kawai K (2012) Metal nanoparticle-induced micronuclei and oxidative DNA damage in mice. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 50(3):211-6
- Song ZM, et al. (2015) Biological effect of food additive titanium dioxide nanoparticles on intestine: an in vitro study. *Journal of applied toxicology : JAT*
- Stern ST, Adiseshaiah PP, Crist RM (2012) Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and fibre toxicology* 9:20
- Stern ST, McNeil SE (2008) Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 101(1):4-21
- Stern ST, Zolnik BS, McLeland CB, Clogston J, Zheng J, McNeil SE (2008) Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots: a common cellular response to nanomaterials? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 106(1):140-52
- Strappazzon F, et al. (2015) AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell death and differentiation* 22(3):517
- Sun Q, et al. (2012a) Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice. *Journal of hazardous materials* 235-236:47-53
- Sun Q, et al. (2012b) Oxidative damage of lung and its protective mechanism in mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part A* 100(10):2554-62
- Takahashi Y, et al. (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9(10):1142-51
- Tan MH, Commens CA, Burnett L, Snitch PJ (1996) A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens. *The Australasian journal of dermatology* 37(4):185-7
- Tanaka Y, et al. (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406(6798):902-6
- Tang Y, Wang F, Jin C, Liang H, Zhong X, Yang Y (2013) Mitochondrial injury induced by nanosized titanium dioxide in A549 cells and rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 36(1):66-72
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2005) Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1(2):84-91
- Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E (2004a) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* 279(35):36268-76
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004b) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(12):2503-18
- Tassinari R, et al. (2014) Oral, short-term exposure to titanium dioxide nanoparticles in Sprague-Dawley rat: focus on reproductive and endocrine systems and spleen. *Nanotoxicology* 8(6):654-62
- Tedja R, Lim M, Amal R, Marquis C (2012) Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS nano* 6(5):4083-93

- Terzano C, Di Stefano F, Conti V, Graziani E, Petroianni A (2010) Air pollution ultrafine particles: toxicity beyond the lung. *European review for medical and pharmacological sciences* 14(10):809-21
- The Project on Emerging Nanotechnologies (2013)
<http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis/>.
- Thurn KT, et al. (2011) Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 7(2):123-30
- Thurnherr T, et al. (2011) A comparison of acute and long-term effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human lung and immune cells in vitro. *Toxicology letters* 200(3):176-86
- Trochimowicz HJ, Lee KP, Reinhardt CF (1988) Chronic inhalation exposure of rats to titanium dioxide dust. *Journal of applied toxicology : JAT* 8(6):383-5
- Tsai TL, et al. (2012) Nucleocytoplasmic transport blockage by SV40 peptide-modified gold nanoparticles induces cellular autophagy. *International journal of nanomedicine* 7:5215-34
- Tsuji JS, et al. (2006) Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 89(1):42-50
- Uemura N, et al. (2015) Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLoS genetics* 11(4):e1005065
- Vales G, Rubio L, Marcos R (2015) Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology* 9:568-78
- van Berlo D, et al. (2014) Apoptotic, inflammatory, and fibrogenic effects of two different types of multi-walled carbon nanotubes in mouse lung. *Archives of toxicology* 88(9):1725-37
- Verma NK, et al. (2012) Autophagy induction by silver nanowires: a new aspect in the biocompatibility assessment of nanocomposite thin films. *Toxicology and applied pharmacology* 264(3):451-61
- Vicencio JM, et al. (2009) The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell death and differentiation* 16(7):1006-17
- Walkey CD, Chan WC (2012) Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society reviews* 41(7):2780-99
- Wan B, et al. (2013) Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Toxicology letters* 221(2):118-127
- Wang JX, et al. (2007) [Influence of intranasal instilled titanium dioxide nanoparticles on monoaminergic neurotransmitters of female mice at different exposure time]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* 41(2):91-5
- Wang S, et al. (2014) The role of autophagy in the neurotoxicity of cationic PAMAM dendrimers. *Biomaterials* 35(26):7588-97
- Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU (2012) Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS nano* 6(2):1251-9
- Warheit DB, Brock WJ, Lee KP, Webb TR, Reed KL (2005) Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO₂ particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 88(2):514-24

- Warheit DB, et al. (2001) Potential pulmonary effects of man-made organic fiber (MMOF) dusts. *Critical reviews in toxicology* 31(6):697-736
- Warheit DB, Webb TR, Reed KL, Frerichs S, Sayes CM (2007) Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 230(1):90-104
- Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2004) Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(12):2541-50
- Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W, Guan JL (2011) Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes & development* 25(14):1510-27
- Wei P, Zhang L, Lu Y, Man N, Wen L (2010) C60(Nd) nanoparticles enhance chemotherapeutic susceptibility of cancer cells by modulation of autophagy. *Nanotechnology* 21(49):495101
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N (2012) Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental science & technology* 46(4):2242-50
- White E (2015) The role for autophagy in cancer. *The Journal of clinical investigation* 125(1):42-6
- Wiesenthal A, Hunter L, Wang S, Wickliffe J, Wilkerson M (2011) Nanoparticles: small and mighty. *International journal of dermatology* 50(3):247-54
- Woodley SM, Catlow CRA (2009) Structure prediction of titania phases: Implementation of Darwinian versus Lamarckian concepts in an Evolutionary Algorithm. *Computational Materials Science* 45(1):84-95
- Wu X, Tan Y, Mao H, Zhang M (2010) Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *International journal of nanomedicine* 5:385-99
- Wu YL, et al. (2013) Biophysical responses upon the interaction of nanomaterials with cellular interfaces. *Accounts of chemical research* 46(3):782-91
- Wu YN, et al. (2011) The selective growth inhibition of oral cancer by iron core-gold shell nanoparticles through mitochondria-mediated autophagy. *Biomaterials* 32(20):4565-73
- Xia T, et al. (2013) Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environmental health perspectives* 121(6):683-90
- Xia T, et al. (2006) Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano letters* 6(8):1794-807
- Xie H, Mason MM, Wise JP, Sr. (2011) Genotoxicity of metal nanoparticles. *Reviews on environmental health* 26(4):251-68
- Xiong S, et al. (2013) Size of TiO₂ nanoparticles influences their phototoxicity: an in vitro investigation. *Archives of toxicology* 87(1):99-109
- Xue C, Liu W, Wu J, Yang X, Xu H (2011) Chemoprotective effect of N-acetylcysteine (NAC) on cellular oxidative damages and apoptosis induced by nano titanium dioxide under UVA irradiation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25(1):110-6
- Xue C, et al. (2010) Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 10(12):8500-7
- Xue X, et al. (2014) Single-walled carbon nanotubes alleviate autophagic/lysosomal defects in primary glia from a mouse model of Alzheimer's disease. *Nano letters* 14(9):5110-7

- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* 23(1):33-42
- Yamasaki R, et al. (2007) Involvement of lysosomal storage-induced p38 MAP kinase activation in the overproduction of nitric oxide by microglia in cathepsin D-deficient mice. *Molecular and cellular neurosciences* 35(4):573-84
- Yamawaki H, Iwai N (2006) Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(6):C1495-502
- Yazdi AS, et al. (2010) Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1alpha and IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(45):19449-54
- Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5(8):1180-5
- Yokoyama T, et al. (2011) EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PloS one* 6(11):e25507
- Yu JX, Li TH (2011) Distinct biological effects of different nanoparticles commonly used in cosmetics and medicine coatings. *Cell Biosci* 1(1):19
- Yu KN, et al. (2015a) Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Autophagic Cell Death via Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane Disruption in Normal Lung Cells. *PloS one* 10(6):e0131208
- Yu KN, Kim JE, Seo HW, Chae C, Cho MH (2013a) Differential toxic responses between pristine and functionalized multiwall nanotubes involve induction of autophagy accumulation in murine lung. *Journal of toxicology and environmental health Part A* 76(23):1282-92
- Yu KN, et al. (2015b) Inhalation of titanium dioxide induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and inflammation in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*
- Yu KN, et al. (2013b) Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 27(4):1187-95
- Yu L, Lu Y, Man N, Yu SH, Wen LP (2009) Rare earth oxide nanocrystals induce autophagy in HeLa cells. *Small* 5(24):2784-7
- Yu Y, et al. (2014) Silica nanoparticles induce autophagy and autophagic cell death in HepG2 cells triggered by reactive oxygen species. *Journal of hazardous materials* 270:176-86
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25):15077-82
- Zhang H, et al. (2009a) Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 110(2):376-88
- Zhang Q, et al. (2009b) Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C60 nanocrystal. *Autophagy* 5(8):1107-17
- Zhang Y, Yu C, Huang G, Wang C, Wen L (2010) Nano rare-earth oxides induced size-dependent vacuolization: an independent pathway from autophagy. *International journal of nanomedicine* 5:601-9

- Zhong Y, et al. (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11(4):468-76
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329):221-5

Annexes

Annexe 1

Publication 1 : *Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity*

Autophagy as a Possible Underlying Mechanism of Nanomaterial Toxicity

Vanessa Cohignac ^{1,2,†}, Marion Julie Landry ^{1,2,†}, Jorge Boczkowski ^{1,2} and Sophie Lanone ^{1,2,*}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Biomédicale (INSERM), U955, Equipe 4, Créteil

94000, France; E-Mails: vanessa.cohignac@inserm.fr (V.C.); marion.landry@inserm.fr (M.L.);

jorge.boczkowski@inserm.fr (J.B.)

² Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil 94000, France

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:

sophie.lanone@inserm.fr; Tel./Fax: +33-149-813-725.

Received: 15 May 2014; in revised form: 23 May 2014 / Accepted: 23 June 2014 /

Published: 8 July 2014

Abstract: The rapid development of nanotechnologies is raising safety concerns because of the potential effects of engineered nanomaterials on human health, particularly at the respiratory level. Since the last decades, many *in vivo* studies have been interested in the pulmonary effects of different classes of nanomaterials. It has been shown that some of them can induce toxic effects, essentially depending on their physico-chemical characteristics, but other studies did not identify such effects. Inflammation and oxidative stress are currently the two main mechanisms described to explain the observed toxicity. However, the exact underlying mechanism(s) still remain(s) unknown and autophagy could represent an interesting candidate. Autophagy is a physiological process in which cytoplasmic components are digested via a lysosomal pathway. It has been shown that autophagy is involved in the pathogenesis and the progression of human diseases, and is able to modulate the oxidative stress and pro-inflammatory responses. A growing amount of literature suggests that a link between nanomaterial toxicity and autophagy impairment could exist. In this review, we will first summarize what is known about the respiratory effects of nanomaterials and we will then discuss the possible involvement of autophagy in this toxicity. This review should help understand why autophagy impairment could be taken as a promising candidate to fully understand nanomaterials toxicity.

Keywords: nanomaterials; oxidative stress; inflammation; autophagy; lysosomes

1. Introduction

Nanotechnologies represent a major technological advance of this last century. Their objects are engineered nanomaterials (at least one dimension in the nanometer range) which possess astonishing physical and chemical properties. The list of actual applications and uses for nanomaterials is already substantial, and will certainly become exponential in the future [1]. In parallel, questions raise regarding the potential (human and environmental) toxicity of these nanomaterials, particularly at the respiratory level. These questions are justified by the knowledge of the toxic effects of micrometric particles from atmospheric pollution on human health, and the fear to get an amplification of these effects because of the (nano) size of the materials blamed.

In this review, we will go through the actual knowledge available in the literature regarding the pulmonary toxicity of nanomaterials, and will discuss on autophagy as a novel mechanism possibly underlying this toxicity.

2. Pulmonary Toxicity of Nanomaterials

Among the nanomaterials family, carbon nanotubes (CNT) and metal oxide nanoparticles (NP) have received the most attention, because of their present and foreseen large production and use in the industry. The following paragraphs are dedicated to describe the lung remodeling manifestations that are currently described in the literature as respiratory consequences to pulmonary exposure to these nanomaterials. Indeed, although it has been described that nanomaterials could enter the blood stream, translocate to other organs [2–4], and induce extra-pulmonary effects, we focused on the respiratory system as it is the better explored as of today. However, in this review we will focus on the respiratory effects as consequences of pulmonary exposure to these nanomaterials. The underlying biological mechanisms proposed at the moment in the literature and the physico-chemical determinants of these effects will be exposed to get a comprehensive overview and understanding of the respiratory toxicity of nanomaterials.

2.1. Lung Remodeling Manifestations

The existing literature on pulmonary health effects of nanomaterials related to respiratory exposure is relatively new [5]. It consists of experiments performed with mice or rats mainly exposed by intratracheal or oro-pharyngeal administration, but also (although more recently) by aerosol. The majority of these studies have mainly focused on two pulmonary manifestations: the formation of granuloma and/or the development of pulmonary fibrosis. Such lung remodeling effects can occur after pulmonary exposure to various types of nanomaterials, namely CNT, iron oxide NP, titanium dioxide (TiO₂) NP, cadmium-doped silica NP, quantum dots, *etc.*, [6–13]. Granuloma formation, consistent with foreign body response [14–16], has been described within hours after the initial nanomaterial administration [12,13] and persist for weeks/months after [10,11,13]. Fibrosis on the other

hand generally takes a few weeks to develop and remains persistent even after a few months [13,16,17]. This histopathological modification can occur either within granulomas or as diffuse interstitial and septal fibrosis, distal to granulomas.

Beside these well-described lung remodeling effects, nanomaterials administration has been in some cases also associated to the development of emphysema-like alterations, as shown after administration of TiO₂ or Fe₂O₃ NP in mice [18,19]. Moreover, the development of mesothelioma, a malignant cancer of the mesothelium most commonly caused in response to asbestos exposure [20], has been reported after exposure to CNT or carbon nanofibers (CNF) [21–23]. Mesothelioma formation was observed in the visceral mesothelium, accompanied by hyperplastic proliferative lesions, inflammatory cell infiltration and inflammation-induced fibrotic lesions of pleural tissue in the lungs of rats exposed to MWCNT [24].

More recently, studies have been performed to address the issue of the pulmonary effects of nanomaterials in the context of preexistent respiratory diseases such as asthma or infection. For example, it has been shown that nickel NP cause exaggerated lung and airway remodeling in T-bet^{-/-} mice, the lack of this transcription factor being implicated in allergic airway inflammation that characterizes asthma [25]. Similarly, exposure to CNT can enhance the susceptibility of mice to develop airway fibrosis in murine models of asthma [26,27]. The same exacerbated fibrotic response has also been described when CNT were administrated concomitantly to Gram positive (*Listeria monocytogenes*) and Gram negative (*E. coli* lipopolysaccharide) bacteria; in both cases, CNT exposure in combination with bacterial infection was able to induce an increased airway fibrosis as compared to bacterial infection alone [28,29]. Finally, TiO₂ NP can either aggravate or protect from airway inflammation and hyperresponsiveness, depending on the dose and timing of NP administration [30,31]. Similar protection has been described for Ag NP, as their pulmonary administration suppresses mucus hyper secretion in asthmatic mice [32]. Overall, the pulmonary effects of nanomaterials in susceptible individuals are currently far from understood. Moreover, it is important to underline that all nanomaterials do not systematically induce lung remodeling (in terms of presence/absence and intensity), depending on various factors (both intrinsic and/or extrinsic to the nanomaterials themselves). This clearly deserves further studies to fully understand the overall (respiratory) toxicity of nanomaterials.

2.2. Underlying Biological Mechanisms

Several biological mechanisms have been described as potentially underlying nanomaterials toxicity. The generation of an oxidative stress and/or the induction of an inflammatory response are the most often evoked (and usually linked), but the literature now also discusses the implication of genotoxicity, as well as the importance of the protein corona surrounding the nanomaterials. These mechanisms are discussed below.

2.2.1. Oxidative Stress

Oxidative stress is defined as the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses, where the pro-oxidant forces exceed the antioxidant forces. Oxidative stress has been proposed to be a common mechanism in nanomaterials pathogenicity [33,34]. Several footprints of oxidative stress have been detected in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and/or in the lung of mice or rats exposed to various nanomaterials, such as CNT [16,35], TiO₂ NP [36] or iron oxides [37]—see [38] for review. For example, this includes the pulmonary expression of Heme Oxygenase-1 (HO-1), a marker of oxidative insult, the presence of lipid peroxidation products such as 4-HydroxyNonenal or 8-isoprostane, and the depletion of glutathione in BALF. These *in vivo* observations were also confirmed *in vitro* in various cell types (either primary cells or cell lines) exposed to nanomaterials [39,40].

The contribution of oxidative stress to nanomaterials toxicity is further exemplified by the fact that oxidant generation is important in developing a toxic response after nanomaterials exposure. Indeed, Shvedova and co-workers demonstrated that mice maintained on a vitamin E deficient diet showed an increased oxidative stress following SWCNT exposure [41]. This was associated with a higher sensitivity to SWCNT-induced acute inflammation: increased number of inflammatory cells and pro-inflammatory cytokine production (tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL6)) and pro-fibrotic response. Similar results were obtained with positively charged Si-core NP [42]. Interestingly, a vitamin E-rich diet protects asthmatic rats from the exacerbation observed in response to CNT [43]. Finally, it has been shown that mice lacking NADPH oxidase, a pro-oxidant enzyme that generates superoxide radicals, exhibited a decreased superoxide anion production by neutrophils and an enhanced acute inflammatory response after SWCNT exposure by pharyngeal aspiration, together with a decreased profibrotic response [44]. All together, these results demonstrate the role of oxidative stress as a mechanism underlying nanomaterials toxicity.

2.2.2. Inflammation

The induction of an inflammatory response has been described in numerous *in vivo* studies, after exposure of rats or mice to various nanomaterials [45–47] see [48] for review. This inflammation is characterized by an early onset, with the recruitment of neutrophils and macrophages in the BALF a few hours only after nanomaterials exposure [47]. This tissue infiltration is usually diminished a few weeks after the initial exposure, although it can persist up to one month [10,49]. The recruitment of inflammatory cells is accompanied by the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL1 β , IL6, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), macrophage inflammatory protein 2 (MIP2) or TNF α in the BALF as well as in the lung tissue [46,49,50]. *In vitro* studies further identified at least macrophages

[51], fibroblasts [52], epithelial [53] and mesothelial cells [54], as potent inflammatory cytokine producers in response to nanomaterials.

2.2.3. Genotoxicity

Due to the size of the nanomaterials, the probability of their internalization into the cells and their interaction with the intracellular environment such as the nucleus is very high. These interactions can damage the genetic material and lead to genotoxic responses characterized by DNA damage and mutations that compromise the successful functioning of the cells and therefore their survival. Genotoxicity can happen because of a direct interaction of nanomaterials with the genetic material of the cells or it can be indirect genotoxicity due to the generation of oxidative stress that in turn will induce oxidative damage to the genetic material [55,56].

Recently, the genotoxic potential of various nanomaterials was reported [57]; several studies demonstrated the existence of DNA damage, chromosomal aberrations or micronucleus induction after exposure to nanomaterials, including metal-based NP and CNT, *in vitro* as well as *in vivo* [58–61]. For example, An and co-workers demonstrated that the interaction of DNA with carbon NP resulted in DNA binding and aggregation both *in vitro* and *in vivo* in a dose-dependent manner [62]. Another study showed that metal-based NP can tightly bind to DNA nucleobases, but also to Watson-Crick base-pairs AT and GC [63]. Besides a direct interaction with DNA, nanomaterials are also able to bind to the active site of proteins implied in DNA “care” leading to their conformational or structural changes, or resulting in a competitive inhibition of the enzyme [64]. Such an event has been described for C60 fullerene that interacts with the human DNA topoisomerase II α , leading to the inhibition of the enzyme activity [65]. Moreover, this nanomaterial may also interact with several proteins involved in the DNA mismatch repair pathway [66].

As discussed before, various nanomaterials have been shown to induce oxidative stress. It is known that ROS can directly attack DNA and generate modified DNA bases. Indeed, nanomaterials such as TiO₂ NP can induce genotoxicity and impair DNA repair activity in cells, via their production of ROS [67], although it is not always true [68,69]. Moreover, pre-treatment with the free radical scavenger N-acetyl-L-cystein (NAC) leads to the inhibition of CNT or zinc oxide NP-induced genotoxicity [70,71].

2.2.4. Interaction with the Protein Corona

When in contact with a biological environment, nanomaterials are rapidly coated with biomolecules that may modify their properties and the way in which they interact with cells [72]. This surface-bound coating is a dynamic mixture of proteins and lipids, called the protein corona. It has been argued that the interaction unit with the cell is not the nanomaterial by itself but the nanomaterial together with its corona of proteins issued from

serum and other body fluids [73,74]. Careful studies have revealed that the composition of this corona is dynamic [75], reflects the size, shape, and surface properties of the nanomaterials, and finally, that it is a major determinant of the localization and subsequent effects of nanomaterials *in vivo* [76]. The two main consequences of the formation of this protein corona can be (i) the modification of the nanomaterials (surface) characteristics and further reactivity [77]; and (ii) the modification of the proteins that interact with the nanomaterial, possibility leading to their altered structural conformation and functionality. Both of these events can be important to nanomaterials toxicity [78,79].

Modification of nanomaterials secondary to their interaction with the protein corona has been exemplified for CNT, which could bind pulmonary surfactant proteins A and D, leading to a susceptibility for lung infection and emphysema in mice [80]. Interestingly, such nanomaterial modification by their proteic surroundings can also enhance their biocompatibility [77] or enable the protein-modified CNT to be non-toxic or less toxic than the pristine ones [79]. Importantly, the formation of a protein corona is dependent on the physico-chemical characteristics of the nanomaterials, and particularly their surface properties. Indeed, studying six different polystyrene NP varying in size and surface chemistries, Lundqvist and colleagues demonstrated that both size and surface properties play a very significant role in determining the protein coronas on particles of identical initial chemistry [76]. The same is true for CNT, which interaction with serum proteins seems to be depending on the intrinsic physico-chemical properties of the CNT [81].

Another important issue of this protein corona formation is that it can induce modifications in the absorbed proteins. To address this issue, Banerjee and co-workers investigated the conformational and functional properties of a large multimeric protein, α -crystallin, absorbed on silver NP surface [82]. The authors demonstrated that the chaperone function and the refolding capacity of the protein, which is primarily governed by the α -crystallin domain, were lost to a significant extent when adsorbed onto silver NP surface, because of the selective alkylation of two cysteine residues at the α -crystallin domain. Nonetheless, the secondary structure of α -crystallin was mostly retained. Another evidence of such protein modification by nanomaterial interaction has been given by Chen and colleagues who showed that when CNT were bound to α -chymotrypsin, the complex could inhibit the enzymatic activity [83]. Finally, a study measured the extent and kinetics of internalization of acid-coated quantum dots, with and without adsorbed native and modified human serum albumin by HeLa cells [84]. Pronounced variations were observed, indicating that even small physico-chemical changes of the protein corona may affect biological responses.

It is important to understand that a nanomaterial entering the pulmonary system may pass through the mucosal layer and enter into the blood stream. At the cellular level, the nanomaterial may moreover be phagocytized and taken to the endosomes that ultimately fuse with lysosomes. Each of these steps represents unique environments, with specific characteristics, that could cause nanomaterial modifications, and therefore lead to the

modification of the protein corona formation [85]. Nanomaterials entered in the body have thus to be considered as evolving systems, that are far from being understood yet.

2.3. Physico-Chemical Determinants

As stated before, all nanomaterials do not systematically induce identical effects (in terms of toxicity, lung remodeling, *etc.*), and the same is true for the biological mechanisms underlying these effects. According to the literature, the (nano)size of nanomaterials is not the only physico-chemical characteristic that plays a critical role in their toxicity [48]. Indeed, among these important characteristics (but the list remains open) are also the chemical composition, shape, crystalline structure, surface chemistry and charge. Importantly, such characteristics, alone or because of interplays among them, will condition the behavior of the nanomaterials, particularly their ability to form aggregates/agglomerates, which will also be a determinant of nanomaterials toxicity.

As it has been discussed in the literature, nanomaterials, whether they are carbon-based, TiO₂, iron NP or other nanomaterials, can induce different biological effects depending on their chemical composition [86]. Moreover, nanomaterials of the same chemical composition, can also exhibit different behaviors [87,88], depending for example on the crystalline structure [52,89], the shape [52], or the number of walls for CNT [88]. For these latter nanomaterials, the length also seems to be important. Indeed, over the past decade, several studies demonstrated that long CNT were more pathogenic than the short ones. However, a more recent investigation observed a higher inflammogenic reactivity for short MWCNT as compared to long MWCNT, most likely due not only to the length reduction but also because of the accompanying surface modifications induced by the length reduction process [90].

Because of synthesis methods, nanomaterials can vary in regards to their remaining contaminants. Potential contaminants of CNT for example include residual metal catalysts (such as iron) that are used during their manufacturing process. These transition metals can induce toxicity by the production of ROS, and Kagan and co-workers demonstrated that, in conditions without cells, SWCNT with 26% iron had a greater potential to produce free radicals than their iron-depleted counterparts (0.23%) [91]. In cellular conditions, the iron-rich SWCNT were able to induce more oxidative stress than the iron-depleted SWCNT on murine macrophages. Moreover, metal chelators were able to reduce the toxicity observed on keratinocytes exposed to iron rich SWCNT (30%) [92], further demonstrating the importance of residual metal contaminants in nanomaterials toxicity. Interestingly, it was recently shown that iron NP can get detached from SWCNT (initially containing 25% iron) in murine macrophages, possibly via a pH-dependent mechanism [93]; the blockage of lysosomal acidification prevented this detachment and protected the cells against SWCNT toxicity. All these data suggest that the remaining contaminants play an important role in nanomaterials toxicity, and that they should be taken into account while assessing nanomaterial toxicity.

Another very important physico-chemical characteristic that needs to be considered is that regarding the surface of nanomaterials. A study from Tabet *et al.* [10] demonstrated that MWCNT-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation were increased by acid-based and decreased by polystyrene-based polymer coating both *in vitro* in murine macrophages and *in vivo* in lung of mice monitored for 6 months. Similarly, another study observed that polyacrylate-coated TiO₂

NP exhibited less cytotoxicity and induced no DNA damage on lung fibroblasts compared to their non-coated counterparts [94]. These findings suggest that surface chemistry of nanomaterials has the ability to modify their behavior and subsequent toxicity.

The aggregation or agglomeration state of nanomaterials also has to be taken into account when looking at nanomaterials effects. Nanomaterials tend to agglomerate (“weak” chemical bonds) and/or aggregate (“strong” chemical bonds) [95]. These unique and larger structures—that can reach the microscale—constituted of nanomaterial aggregates and/or agglomerates are more complex and more difficult to characterize. As it changes properties such as the surface area, it may modify the deposition into the lung, and therefore nanomaterial effects. Kreyling and co-workers showed that the translocation, from the lung of rats to their blood and other organs, is higher for agglomerates composed of 20 nm primary diameter iridium NP as compared to 80 nm ones [2]. In contrast, Noel and colleagues demonstrated a similar pattern between agglomerates of different sizes; after their inhalation, TiO₂ agglomerates of 30 and 185 nm (primary diameter of NP) showed a similar lung deposition and both agglomerates resulted in comparable adverse effects in rats [36].

From all these studies, it appears that if data from the literature largely support the hypothesis that the physico-chemical characteristics of nanomaterials are important determinants of their toxicity, it is currently very difficult to clearly identify one characteristic of higher importance than another; one has to consider the role of the intricacy of these characteristics rather than the importance of one single characteristic alone. Such remark also reflects the difficulty to modify one characteristic at a time, and therefore to address its exact role in the nanomaterial’s toxicity.

As illustrated in this short overview of nanomaterials toxicity, it appears that pulmonary exposure to nanomaterials can lead to lung remodeling, with a probable important contribution of the physico-chemical characteristics of the nanomaterials. Although several biological mechanisms have been suggested to underlie these effects, they cannot, however, explain all nanomaterials toxicity. Recently, autophagy has emerged as a potential contributor of nanomaterials toxicity. This will be discussed in the following paragraphs.

3. Autophagy

Autophagy, derived from the Greek roots for « self-eating », is a general term standing for a cellular catabolic process in which cellular components, including organelles and macromolecules, are delivered to the lysosomes for degradation. Three types of autophagy

have been described: microautophagy, chaperone-mediated autophagy and macroautophagy. Microautophagy involves the invagination of the lysosomal membrane, which leads to the sequestration and degradation of cytosolic components into the lysosome. Chaperone-mediated autophagy involves the selective translocation of altered proteins across the lysosomal membrane through chaperone proteins, which allows their recognition and unfolding, and, through the membrane receptor LAMP2a (lysosomal-associated membrane protein 2a), allows the translocation of the protein into lysosomes.

Macroautophagy, hereafter referred as autophagy, is characterized by the formation of a double membrane vesicle called autophagosome, which sequesters the cytoplasmic material to be degraded. Autophagosome then fuses with a lysosome to form an autolysosome in which the lysosomal enzymes will degrade the cargo. The resulting degradation products are recycled to maintain nutrient and energy homeostasis.

In most cell types, autophagy occurs at basal rate to maintain normal cellular homeostasis by eliminating misfolded proteins and damaged organelles. However, this process can be induced under stress conditions, such as metabolic stress (amino acid or growth factors deficiency), hypoxia or reticulum stress, to allow cell survival. As such, autophagy has been shown to play a key role in diverse pathologies, such as cancer, neurodegenerative, inflammatory and pulmonary diseases [96,97]. The involvement of autophagy in these pathologies can be associated to its role in the modulation of oxidative stress and inflammatory responses. As inflammation and oxidative stress are the most widely described mechanisms underlying nanomaterial-mediated toxicity, a growing amount of studies suggest that autophagy could be a potential new mechanism explaining, at least in part, the toxicity of nanomaterials. In this part of the review, we will describe the autophagy process in detail and we will briefly present evidences of its involvement in diverse pathologies.

3.1. Autophagy Machinery

The autophagy machinery can be divided into several steps: initiation, autophagosome formation, and autophagosome-lysosome fusion followed by the degradation and recycling of the cargo (see Figure 1). More than 30 genes are involved in the regulation of this process.

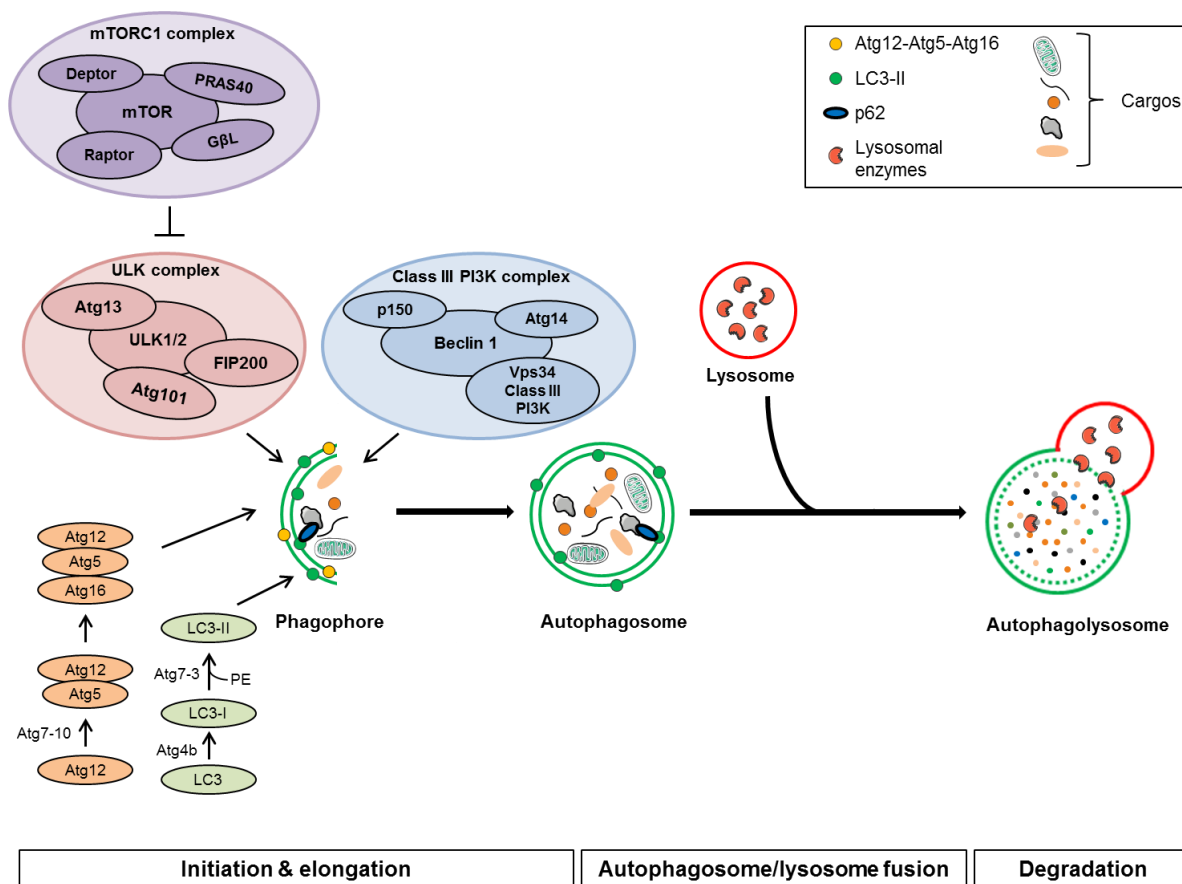


Figure 1. Scheme of the autophagic pathway

3.1.1. Initiation

During the initiation step, an isolation membrane, called phagophore, is formed around the cargo. The exact origin of this membrane is not yet completely identified. Indeed, there may be multiple sources: the phagophore could be generated *de novo* from preexisting intracellular precursor proteins but it could also be derived from cellular structures such as endoplasmic reticulum [98,99], outer membrane mitochondria [100], Golgi [101] or plasma membrane [102]. The initiation step of autophagy involves two major macromolecular complexes: the mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) and the class III PI3K complex (class III phosphatidylinositol-3-kinase).

The mTORC1 complex is composed of the protein kinase mTOR, Raptor (regulatory associated protein of mTOR), GβL (mammalian G protein β-subunit-like protein), Deptor

(DEP domain-containing mTOR-interacting protein), and PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa). This complex can interact with the ULK complex (UNC-51-like kinase) composed of ULK1/2, Atg13 (autophagy related gene 13), FIP-200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa) and Atg101. During nutrient-rich conditions, mTORC1 is activated and phosphorylates Atg13 and ULK1/2, which inhibits the ULK kinase activity thereby inhibiting the autophagy process. Conversely, when mTORC1 is inhibited, by starvation or rapamycin treatment for example, it dissociates from ULK complex, resulting in the activation of ULK and the induction of autophagosome formation.

The second macromolecular complex implicated in the initiation step of autophagy is the PI3K complex consisting of a class III PI3K, Vps34 (vacuolar protein sorting 34), p150, Beclin 1, and Atg14. This complex formation is necessary for Vps34 activation to produce PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate), a lipid molecule essential to the formation of autophagosomes through the recruitment of proteins required for the elongation of the phagophore [103,104]. Other regulatory proteins, including Ambra1, UVRAG (UV radiation resistance-associated tumor suppression gene protein), Rubicon, Bif-1 and the anti-apoptotic Bcl-2 or Bcl-xl can also interact with the PI3K complex to modulate its activity [105–108].

3.1.2. Autophagosome Formation and Elongation

Once the autophagy is initiated, the phagophore elongates, leading to the formation of a double membrane vesicle, the autophagosome. Two ubiquitin-like conjugation systems are involved in the elongation of pre-autophagosomal structures. In the first conjugation system, Atg12 is conjugated to Atg5 by Atg7 (E1 ubiquitin-activating enzyme-like) and Atg10 (E2 ubiquitin-conjugase-like). Atg16L is then linked to Atg12-Atg5 via its coiled-coil domain to form a 800 kDa complex, which is essential for the elongation of pre-autophagosomal structures [109,110]. This macro-complex will dissociate from mature autophagosome.

The second conjugation system leads to the formation of LC3-PE (microtubule associated-protein 1 light chain 3-phosphatidylethanolamine) conjugate. The precursor of LC3 is cleaved at its COOH terminus by the protease Atg4B to generate the LC3-I form. LC3-I is then conjugated to PE by Atg7 (E1-like) and Atg3 (E2-like) to form LC3-II [111,112]. Unlike the Atg12-Atg5-Atg16L complex, LC3-II remains on completed autophagosomes until their fusion with lysosomes. At that time, LC3-II molecules present on the cytosolic face of the autophagosome will be recycled through cleavage by Atg4 [112] and LC3-II on the inner membrane of autophagosomes will be degraded within the autolysosome by proteolytic activity.

Connections between the two conjugation systems have been reported. It has been shown that the Atg12-Atg5 conjugate can have an E3 ubiquitin ligase activity to facilitate LC3 conjugation [113]. Moreover, it has been shown that the Atg12-Atg5-Atg16L complex and the interaction between Atg12 and Atg3 could specify the site of LC3 lipidation [114].

3.1.3. Autophagosome/Lysosome Fusion and Degradation

In the final steps of autophagy, the mature autophagosomes fuse with lysosomes to form autolysosomes. In mammalian cells, the autophagosomes are formed randomly in the cytoplasm. Thus, autophagosomes need to reach lysosomes, mainly localized perinuclearly around the microtubule-organizing center (MTOC) [115]. This transport towards MTOC requires the involvement of microtubules and is mediated by the motor proteins dyneins [116,117]. Thus, inhibition of this transport, through depolymerization of microtubules or inhibition of motor proteins, could lead to an autophagy blockade [118].

Autophagosome-lysosome fusion is mediated by several proteins, including small GTPases (such as Rab7), syntaxin 5, several SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor), LAMP1 and LAMP2 (lysosome-associated membrane protein) and the class C Vps proteins [119–123].

After fusion with the lysosome, the inner membrane of the autophagosome and the cytoplasmic material sequestered in autophagosomes are degraded by lysosomal acid hydrolases including proteinases A and B, and cathepsins B, D and L [124]. The resulting products of this degradation, especially amino acids, are then transported back to the cytosol for reuse.

It is interesting to note that, before the autophagosome/lysosome fusion, the autophagosome may also fuse with an endosome to form an amphisome, thus establishing a connection between endocytosis and autophagy [125]. Amphisome formation involves several proteins including Rab11, the HOPS complex, and components of multiple ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) complexes that mediate cargo sorting into intraluminal vesicles of the multivesicular bodies [126,127].

3.1.4. Evaluation of Autophagic Activity

Because autophagy is a dynamic process, there is an essential need to measure the autophagic flux; the assessment of the number of autophagosomes alone (by electron transmission microscopy or by quantifying the expression of LC3 protein expression) is indeed not enough to conclude about the efficiency of autophagy. LC3-II is associated with the autophagosome membrane, which makes it a useful marker of autophagosomes but not of autophagic flux. Indeed, the quantification of LC3-II protein expression at a given time is the result of a balance between LC3-II formation and degradation. Therefore, an analysis only based on LC3-II levels quantification cannot discriminate between two opposite scenarios: an autophagy activation (LC3-II formation) *versus* a blockade in the downstream step in autophagy (absence of LC3-II degradation), which implies a defective autophagy [128,129]. It is therefore essential, to be able to conclude about autophagy characterization and distinguish between these two possibilities autophagy pathway, to combine the analysis of autophagosome quantification with autophagic flux assays. Autophagy flux can be monitored using inhibitors of the fusion of autophagosomes with lysosomes. Lysosomotropic reagents such as bafilomycin A1 or chloroquine, which inhibit acidification

inside lysosomes or the autophagosome-lysosome fusion, block LC3-II degradation leading to its accumulation. As a result, the difference of LC3-II levels between samples in the presence and in the absence of inhibitors reflects the autophagic flux. Similarly, inhibitors of lysosomal proteases such as E64d or pepstatin A can be used to measure autophagic flux [130]. Finally, autophagic flux can also be assessed by measuring the levels of substrates normally degraded by autophagy such as p62/SQSTM1 (sequestosome 1); p62 is a protein directly bound to LC3-II which acts as a cargo receptor for the degradation of ubiquitinated proteins targeted by autophagy. Increased levels of p62 are therefore reliable indicators of dysfunctional autophagy and increased autophagic flux is indicated by decreased p62 levels [131]. A detailed review on the methods for monitoring autophagy has been written recently by Klionsky *et al.* [128].

3.2. Autophagy in Physiological and Pathological Conditions

Basal autophagy, by maintaining cellular homeostasis, represents an important process in the physiology of many organs. A variety of functions, especially the elimination of organelles, macromolecules and pathogens, that are being assigned to autophagy can explain, at least in part, its involvement in a large number of diseases [96,97,132]. Autophagy dysfunction has been described in pulmonary diseases as in others organs. This will be discussed in the following paragraphs.

3.2.1. Autophagy and Lung Diseases

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which mainly results from chronic exposure to cigarette smoke, is the better studied lung disorder focusing on the role of autophagy. An accumulation of autophagosomes and enhanced levels of LC3-II and others autophagy-related proteins (Atg4, Atg5/12 and Atg7) have been observed in lung biopsies from patients with COPD [133]. An induction of autophagosome formation was also observed in different human lung cell types (epithelial cells and fibroblasts) exposed to cigarette smoke extract [133–135]. Furthermore, the genetic depletion of LC3-II or Egr-1 (early growth response-1), a molecule involved in LC3B transcription, was associated with a resistance to emphysema in mice after exposure to cigarette smoke [133,136]. These results suggested that the stimulation of the autophagic pathway might be deleterious, mainly by promoting airspace enlargement in response to cigarette smoke. Monick and colleagues also showed an accumulation of autophagosomes (TEM visualization and LC3-II level) as well as in alveolar macrophages from actively smoking patients, but also in alveolar macrophages of nonsmokers exposed to cigarette smoke extract *in vitro* [137]. Interestingly, by investigating the autophagic flux (using inhibitors studies and quantifying p62 expression), the authors concluded that the autophagy was not functional. They suggested that this autophagy defect leads to functional abnormalities of alveolar macrophages, especially an inability to clear bacteria from the alveolar surface (with a decreased lysosome delivery of bacteria in these cells), which could explain the recurrent

infections observed in smokers such as in pneumonia. Taken together, these studies suggest an important role of autophagy in COPD progression.

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disorder characterized by a mutation in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). In 2010, Luciani *et al.* showed that human and mice CF airway epithelia displayed defective basal autophagy as evidenced by decreased levels of LC3-II protein and increased levels of p62 [138]. Moreover, it has been observed that the defective CFTR protein leads to an autophagy inhibition by Beclin1 sequestration in aggresomes in airway epithelial cells, and that the restoration of autophagy by overexpression of Beclin1 restored CFTR trafficking, reduced its accumulation in aggresomes and reverts the CF airway phenotype [138]. Furthermore, treatment with rapamycin, an autophagy inducer, can limit the infection by *Burkholderia cenocepacia*, potentially lethal to CF patients, and decrease the associated inflammation in the lungs of CF mice [139]. Taken together, these studies suggest that autophagy deficiency is associated with cystic fibrosis and the related pulmonary inflammation.

Autophagy also seems to be implicated in the development of pulmonary arterial hypertension (PH). Indeed, elevated levels of LC3B were observed in an experimental mouse model of chronic hypoxia-induced PH but also in the lung of PH patients [140]. In addition to these data, it has been observed that LC3B^{-/-} mice, but also Egr1^{-/-} mice, showed an increased susceptibility to hypoxia induced-PH as compared to wild-type mice [140]. These results suggest that the autophagy pathway exerts a protective role during the pathogenesis of PH.

Similar effects of autophagy have been observed in others pulmonary diseases such as α 1-antitrypsin deficiency, mycobacterium tuberculosis, tuberous sclerosis or acute lung injury and are discussed elsewhere [141–143].

3.2.2. Autophagy and Cancer

The link between autophagy and cancer is complex given that autophagy can act both as tumor suppressor and tumor promoter. Indeed, on one hand, autophagy, which is able to degrade oncogenic proteins substrates, potential carcinogenic misfolded proteins and damaged organelles, can suppresses the initiation and the development of tumors. However, on the other hand, autophagy can assist the survival of established tumors by providing nutrients to tumoral cells that are in conditions of hypoxia and nutrient deprivation. Part of an explanation resides in the fact that many of the signaling pathways regulating autophagy imbricate with those regulating tumorigenesis. Indeed, several tumor suppressor genes such as PTEN, TSC1/2, UVRAG and p53 positively regulate autophagy [96,144]. Conversely, oncogenes such as class I PI3K, Akt or Bcl2 inhibit autophagy [107]. An example of the existing link between the autophagy machinery and human cancer has been proposed in a study by Liang *et al.* [145] published in 1999. The authors showed that, in a high percentage of human cancers (breast, ovarian and prostate cancers), Beclin1 gene was mono-allelically

deleted and that its expression was decreased. Moreover, haploid-insufficiency of Beclin1 promotes tumorigenesis in various tissues in transgenic mice [146]. Similarly, homozygote deletion of Atg5 was shown to predispose mice to liver tumors [147]. Conversely, in some cases, autophagy can also promote the survival of cancers cells in inhospitable environments, when insufficient vascularization limits nutrient and oxygen supply to the cells [148,149]. Thus, induction of autophagy allows cancer cells to survive and subsequently favors tumor progression. Altogether, targeting autophagy in cancers should provide new opportunities for cancer treatment but these strategies could be complex to implement because of the dual role of autophagy in cancer.

3.2.3. Autophagy, Inflammation and Oxidative Stress

Two common mechanisms might account for the important role of autophagy in physiological and pathological conditions; the interplay of autophagy with inflammation and oxidative stress.

Autophagy plays a crucial role in inflammation. Inflammasomes are multiproteins complexes which promote the processing and the secretion of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 [150]. Basal autophagy, by degrading cells debris or defective organelles which can activates the inflammasome, can negatively regulate inflammasome activation [151,152]. For example, an autophagy blockade leads to the accumulation of damaged mitochondria, which produce ROS, which in turn can activate the NLRP3 inflammasome [152]. In addition to control the production of cytokines by regulating the activation of inflammasomes, autophagy can also directly target pro-IL-1 β for lysosomal degradation [153]. Importantly, Shi and colleagues, showed that the activation of inflammasomes in macrophages leads to the formation of autophagosomes and that a blockade of autophagy exacerbated the inflammasome activation [154]. These results indicate that there is a negative feedback loop where the inflammasome activation leads to an activation of autophagy that in turn negatively controls inflammation by clearing the active inflammasome. Moreover, efficient autophagy also limits inflammation by degrading apoptotic bodies, which can release damage-associated molecular pattern molecules, which can trigger inflammation [155].

In addition to these data, it has been shown that the endotoxin-induced production of IL-1 β and IL-18 was enhanced in mice deficient for Atg16L1 [156]. Similarly, mice deficient for LC3b were found to be more susceptible to lipopolysaccharide than wild type mice, with higher serum concentrations of IL-1 β and IL-18 [151]. Importantly, autophagy is also involved in the transcriptional regulation of genes involved in the inflammatory response. Indeed, when autophagy is deficient, p62 protein, a substrate of autophagy, accumulates and leads to TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6) oligomerization and to the further activation of NF- κ B, a transcription factor involved in inflammation [157–159]. Furthermore, autophagy genes are associated with inflammatory disorders such as Crohn's disease, a chronic inflammatory disease of the intestine. Indeed,

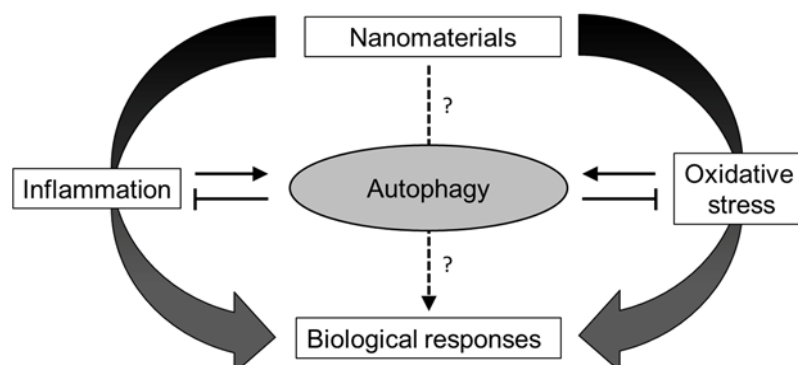
polymorphisms in autophagy-associated genes, such as Atg16L1, Irgm1 (immune-related GTPase M-1) but also Ulk1, are associated with Crohn's disease [160,161].

The interplay between autophagy and oxidative stress occurs at the level of ROS production. Indeed, it is known that starvation can increase ROS production, in particular O_2^- and H_2O_2 , and thus activate autophagy [162,163]. In these studies, it has been shown that H_2O_2 induces autophagy via an inactivation of Atg4 at the site of autophagosomes formation, thus allowing the conversion of LC3-I to LC3-II, which, as mentioned before, is crucial for the initial steps of autophagy [163]. Moreover, autophagy has been shown to be induced in glioma cells treated with exogenous H_2O_2 through the Beclin 1 and Akt/mTOR pathways [164]. Further support for a role of ROS in the induction of autophagy comes from studies showing that the induction of autophagy by starvation is dependent of O_2^- production, as the overexpression of SOD and/or catalase protects HeLa cells for starvation-induced autophagy [162].

Conversely, autophagy can also suppress ROS production. Indeed, impairment in the autophagy process leads to increased oxidative stress [165–169]. Moreover, autophagy plays a crucial role for the degradation of damaged mitochondria, which are the main sources of ROS generation. Indeed, a selective mitochondrial autophagy, called mitophagy, can act as a defense mechanism against oxidative stress by clearing damaged mitochondria [170]. For example, it has been shown, in mitophagy-deficient cells, that there was an increase production of ROS [171]. Additionally, several studies suggest that autophagy may have a key role in the degradation of oxidized proteins, in particular via the chaperone-mediated autophagy [172,173]. In response to oxidative stress, the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 transcription factor (Nrf2), involved in the transcription of antioxidants genes such as hemeoxygenase, can induce p62 expression which in turn, activates Nrf2, subsequently forming a positive feedback loop [174,175] to reduce the oxidative response. Moreover, because of its role in delivering protein aggregates to autophagosomes, p62 may be involved in the elimination of oxidized proteins.

Overall, autophagy is a well-conserved physiological process aimed to maintain cellular homeostasis. Alterations of the autophagic process (*i.e.*, abnormal activation and/or deficient activity) are associated with various diseases, and are probably link to the interplay between autophagy and inflammation and/or oxidative stress. Since these two mechanisms are largely described as underlying nanomaterials effects, the involvement of autophagy in nanomaterials toxicity has received a significant amount of interest lately and will be developed in the following paragraphs (Figure 2).

Figure 2. Hypothetic relationship between the autophagy and the biological responses to nanomaterial.



4. Nanomaterial-Induced Autophagy Perturbation

In this chapter, we chose to extend our review beyond the pulmonary perspective, to get a better overview of nanomaterial-induced autophagy perturbation.

4.1. Evidences of Autophagy Perturbation by Nanomaterials

When deciphering the literature on the subject, it appears that it is (roughly) divided in two major types of studies based on their experimental set-up; those limited to the observation of autophagosome (reported in Table 1), and those which go further and report analysis of the autophagic flux (reported in Table 2). As stated earlier, to be able to conclude on autophagy involvement in response to whatever exposure, it is essential to combine the analysis of autophagosome quantification with autophagic flux assays. However, given the important number of studies presenting a lack of deep investigation, and the incomplete associated conclusions, we chose to present the existing literature, as is it as of today.

Several classes of nanomaterials have been studied, mainly metal oxides NP and CNT. The large majority of studies used cell lines, a smaller amount using primary cells. Only rare studies showed data on animal models [176], probably because of the difficulty to use relevant methods to assess autophagy *in vivo*. A large part of the experiments reported increased numbers of autophagosomes in response to nanomaterials, observed either by the quantification of autophagosome markers expression (LC3-II, Atg5, *etc.*), or by TEM observations. This is true for metal oxides NP [177,178], graphene nanosheets [179] or silver nanowires [180] (Table 1). All these data suggest that nanomaterials can modify the autophagic pathway, essentially leading to the accumulation of autophagosomes. Some studies showed an implication of the Akt/mTOR pathway in these effects, such as that by Roy and co-workers showing an enhancement of autophagosome formation in mouse peritoneal macrophages exposed to zinc oxide NP, through the inhibition of the Akt/mTOR pathway, ultimately leading to apoptosis [181].

Table 1. A summary of nanomaterial-induced autophagy dysfunction in the literature: focus on autophagosomes formation.

Nanomaterial	Model(s)	Autophagy markers	Experimental techniques	Results	Reference
Gold NP	MRC5 human lung fibroblast cell line	Beclin1, Atg5, Atg7, Atg12, LC3	TEM, immunoblot	Increase of autophagosomes formation	[187]
Iron oxide NP	RAW 264.7 murine peritoneal macrophage cell line	Beclin1, Atg5, LC3, p62	TEM, immunoblot, p62 immunostaining	Increase of autophagosomes formation	[178]
Silica NP	A549 lung epithelial cell line	LC3	TEM, MDC staining, immunoblot	Increase of autophagosomes formation	[188]
Silver NP	NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts	Beclin1, LC3, p62	TEM, acridin orange staining, immunoblot	Increase of autophagosomes formation	[177]
Zinc oxide NP	Mouse peritoneal macrophages	Atg5, Atg10, Atg12, LC3	TEM, qRT-PCR, LC3 immunostaining, immunoblot	Increase of autophagosomes formation	[181]
Hydroxyl C60 fullerene NP	HUVEC human umbilical vein endothelial cell line	LC3	TEM, immunoblot	Increase of autophagosomes formation	[189]
Polymeric NP	NR8383 rat alveolar macrophage cell line	Atg16L1, LC3	TEM, microarray, immunoblot, qRT-PCR	Increase of autophagosomes formation	[190]
Graphene oxide nanosheets	RAW 264.7 murine peritoneal macrophage cell line	Beclin1, LC3	TEM, immunoblot, immunostaining	Increase of autophagosomes formation	[179]
Silver nanowires	THP-1 monocytic cell line, iBMM cell line	LC3	TEM, stable GFP-LC3 transfection, immunoblot	Increase of autophagosomes formation	[180]

NP: nanoparticle, MDC: monodansylcadaverine.

Going into deeper analysis, studies reported in Table 2 demonstrate that nanomaterials such as metal oxides [182,183], dendrimers [176] or CNT [184,185] can lead to an increased number of autophagosomes because of a blockade of autophagic flux. Indeed, Orecna and colleagues reported in HUVEC cells exposed to carboxylated MWCNT, an increased expression of LC3-II protein, without a further enhancement in presence of Bafilomycin A1, together with an increase of p62 protein expression [184]. In this case, the accumulation of autophagosomes can be attributed to a blockage in the autophagy flux; the autophagosomes accumulate, attested by an increase of LC3 levels, without the formation of autolysosomes (no degradation of p62 protein). Similar results have been reported for other nanomaterials such as SWCNT, graphene oxide or gold NP [185]. Interestingly, Sun and colleagues reported the only study demonstrating an increased autophagosome formation along with an increase of autophagy flux in A549 lung epithelial cells exposed to copper oxide NP [186].

Table 2. A summary of nanomaterial-induced autophagy dysfunction in the literature: focus on modifications of autophagic flux.

Nanomaterial	Model(s)	Autophagy markers	Experimental techniques	Results	Reference
Copper oxide NP	A549 lung epithelial cell line	Atg5, LC3	TEM, immunoblot, GFP-LC3 transfection, Atg5 siRNA	Increase of autophagosome formation with an increase of autophagy flux	[186]
Iron oxide NP	A549 lung epithelial cell line	Akt signaling, Atg5, Atg12, LC3	Immunoblot	Accumulation of autophagosomes due to a decrease in autophagy flux	[182]
PAMAMdendrimer	A549 lung epithelial cell line, Balb/c mice	Atg6, LC3	TEM, immunoblot, GFP-LC3 transfection	Accumulation of autophagosomes due to a decrease in autophagy flux	[176]
MWCNT	A549 lung epithelial cell line	LC3	Immunoblot, qRT-PCR, GFP-LC3 transfection	Accumulation of autophagosomes due to a decrease in autophagy flux	[191]
SWCNT and graphene oxides	Mouse peritoneal macrophages	LC3, p62	GFP-LC3 transfection, immunoblot, lysotracker	Accumulation of autophagosomes due to a decrease in autophagy flux and lysosomal impairment	[185]
Carboxylated MWCNT	HUVEC human umbilical vein endothelial cell line	LC3, p62	TEM, immunoblot, RFP-LC3 and GFP-LC3 transfection	Accumulation of autophagosomes due to a decrease in autophagy flux	[184]

In view of the current literature, it is currently not possible to definitively conclude on the interplay between nanomaterials and autophagy. Unfortunately, part of this situation is the result of inadequate methodological assessment of autophagy, too many studies only quantifying the number of autophagosomes to address the whole autophagy machinery. Excellent guidelines have been published recently in the literature and it is an absolute necessity to follow them to adequately conclude on nanomaterials-induced autophagy perturbations [128].

4.2. Mechanisms of Autophagy Perturbation by Nanomaterials

The mechanisms of nanomaterials-induced autophagy perturbation are not completely understood yet, but an impairment of the autophagosome-lysosome fusion and/or a defect in lysosome function could represent potential targets.

As stated before, the cytoskeleton, a highly dynamic cellular scaffold that supports cell shape and regulates the intracellular trafficking has an important role in autophagy. Indeed, several studies revealed the importance of the microtubular network, and to a lesser extent, of the actin cytoskeleton in the formation and the fusion of autophagosomes with lysosomes [192]. In rat hepatocytes and cells, the disruption of microtubules or actin microfilaments by agents such as nocodazole, vinblastine or cytochalasin B and D resulted in the accumulation of autophagic vacuoles, reflecting an inhibition of autophagic flux [193,194]. More recently, studies showed that, once formed, autophagosomes move along microtubules to concentrate at the perinuclear region around the MTOC, where the majority of the lysosomes are found, to fuse with them [115,195]. Moreover, in basal autophagy but not in starvation-induced autophagy, histone deacetylase-6 has been shown to control the fusion of autophagosomes to lysosomes by the actin remodelling machinery [196].

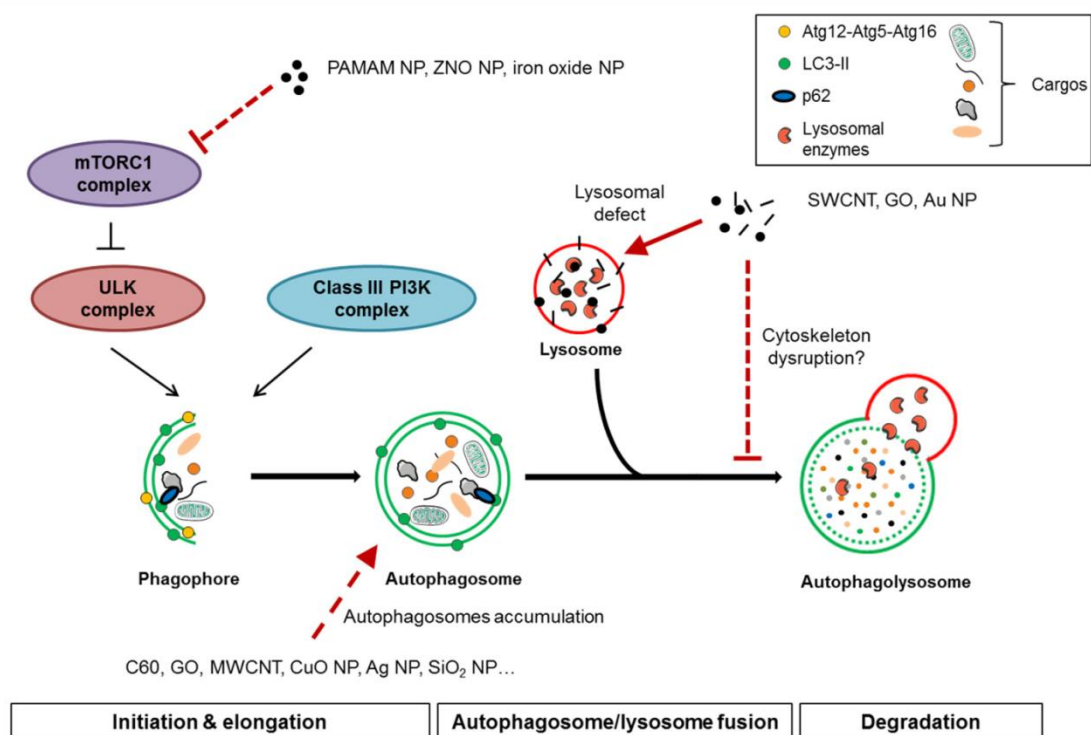
After passing the cell membrane, nanomaterials could interact with the proteins of the cytoskeleton, affect their functions and then, as described above, potentially lead to an impairment of the autophagy process. This has been particularly described for actin and tubulin proteins. For example, inhibition of tubulin polymerization by gold NP has been shown in a cell free system [197]. Moreover, fullerene derivative carbon NP and TiO₂ NP were found to inhibit microtubule polymerization, potentially by a hydrogen bond between NP and the tubulin heterodimer [198,199]. More recently, a study described that SWCNT can directly bind to actin via hydrophobic interactions which leads to changes in actin structure [200]. A study on the effects of silicon dioxide NP on A549 cells reported differences in the expression levels of proteins associated with the regulation of actin cytoskeleton [201]. Gold nanomaterials have been shown to have a dose-dependent effect on actin stress fibers in human dermal fibroblasts, thereby inducing cytotoxicity [202]. Furthermore, in the same cell type, gold NP have been described to induce a disruption of the cytoskeleton, despite no change in actin and β -tubulin protein expression [203]. However, the disruption of the cytoskeleton was reversible given that the cytoskeleton could reconstitute following NP removal. Exposure to magnetic NP, such as iron oxide (Fe₂O₃) ones, could also alter cell function in pheochromocytoma neuronal cells by decreasing the number of actin filaments [204]. Consequently, these cells were not able to extend neurites in response to nerve growth factor. In PC12 cells, ferromagnetic mineral magnetite (Fe₃O₄) leads to alterations in microtubule polymerization, potentially induced by a direct bind to tubulin dimer [205]. Moreover, exposure to iron oxide nanomaterials on human umbilical vein endothelial cells leads to a significant disruption of cytoskeletal structures, with diminished vinculin spots, and disorganized actin and tubulin networks. Interestingly, in addition to the observed cytoskeleton disruption, this study also suggests an autophagy dysfunction that could explain the toxic effects of particles [206]. Similar effects on cytoskeleton were observed in response to a high concentration of various Fe₂O₃ nanomaterials in murine neural progenitor cells and human blood outgrowth endothelial cells [207]. Additionally, researchers have shown that fullerenol treated renal proximal tubule cells displayed actin disruption and clamping associated with autophagic vacuole accumulation. The authors suggest that cytoskeleton disruption, by interfering with the autophagy processing, may be an explaining mechanism of fullerenol cytotoxicity [208].

Because of the involvement of lysosomes in the final steps of the autophagy process, a lysosome dysfunction could also be a mechanism explaining a defect of the autophagy pathway leading to nanomaterials-induced toxicity. Indeed, several types of nanomaterials have been recognized as being associated to lysosomal dysfunction. For example, MWCNT, with a diameter <8 nm, induced lysosomal membrane destabilization (LMD) in 3T3 fibroblasts, leading to the release of lysosomal contents inside the cytoplasm. This was associated with an increased ROS production [209]. However, no or minor lysosomal damage were observed with larger MWCNT, or with nanomaterials of different composition (TiO₂, SiO₂) and in other cell types (telomerase-immortalized human bronchiolar epithelial cells and RAW 264.7 macrophages). In another study, G5-polyamidoamine dendrimers

have been shown to be taken up into the lysosomal compartment and to modify the lysosomal pH, increasing the cytotoxicity [210]. Likewise, gold NP can accumulate in lysosomes and cause lysosomal dysfunction by increasing the lysosomal pH in rat kidney cells [183]. Interestingly, a blockade of the autophagy flux was also observed in these cells, suggesting lysosomal dysfunction as a likely mechanism of autophagy blockade. However, although most studies showed an elevation of the lysosomal pH in response to treatment with NP, this propensity of NP to accumulate in lysosomes could be presented as a strategy to treat lysosomal defects. Indeed, researchers used acidic NP to lower the pH of compromised lysosomes in human retinal pigment epithelial cells and thus to improve their degradative function [211]. The occurrence of lysosomal destabilization as a mechanism of TiO₂ NP-induced cytotoxicity has also been proposed in mouse fibroblast cells and in bronchial epithelial cells [212,213]. Moreover, it has been shown that exposure to zinc oxide NP in human monocytic THP-1 cells induced a decrease of lysosomal stability together with a loss of viability [214]. The authors suggest that the lysosomes were destabilized by the production of Zn²⁺ ions formed by the dissolution of ZnO NP into the acidic lysosomes. The release of the lysosomal content and Zn²⁺ ions into the cytoplasm may damage other organelles and lead to cell death. Likewise, TiO₂ nanobelts and amino-functionalized polystyrene NP have been shown to induce toxicity by a loss of lysosomal integrity and a subsequent release of cathepsins which could lead to cell death, oxidative stress and inflammation [215,216]. Recently, in mouse peritoneal macrophages, CNT have been shown to induce lysosome impairment, characterized by an overload of lysosomes by nanomaterials and a decreased lysosomal stability and biogenesis, associated with a dysfunction of autophagy [185].

Taken together, the disruption of cytoskeleton together with a defect in the lysosome function could represent essential mechanisms explaining how nanomaterials could perturbate the autophagy process (see Figure 3). However, these mechanisms deserve further attention, as they are far from being completely understood yet.

Figure 3. Nanomaterial-induced autophagy perturbation. Full lines relate to direct evidences of interaction of nanoparticles (NP) with the autophagic process whereas dotted lines relate indirect evidences of such interactions.



5. Conclusions

In conclusion, autophagy dysfunction could represent a good candidate to explain, at least in part, nanomaterials toxicity. The deep understanding of the underlying mechanisms involved in this interaction between nanomaterials and the autophagy process certainly deserve much attention from researchers in the nanotoxicity-field to help the development of safer nanomaterials.

Acknowledgments

Vanessa Cohignac is supported by a fellowship from C’Nano Ile-de-France. C’Nano-IdF is the nanoscience competence center of Paris Region, supported by CNRS, CEA, MESR, and Région Ile-de-France. Marion Landry is supported by a fellowship from Agence Nationale de la Sécurité sanitaire, de l’environnement et du travail (Anses). The authors would like to acknowledge the support they obtained from DHU A-TVB (Département Hospital-Universitaire Ageing-Thorax Vessel Blood) and from the Labex SERENADE (11-LABX-0064).

Author Contributions

Vanessa Cohignac and Marion Landry equally wrote the first draft of the manuscript. Together with Jorge Boczkowski, Sophie Lanone worked on its further and final elaboration. All authors approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. The Project on Emerging Nanotechnologies. Available online: <http://www.nanotechproject.org> (accessed on 23 May 2014).
2. Kreyling, W.G.; Semmler-Behnke, M.; Seitz, J.; Scymczak, W.; Wenk, A.; Mayer, P.; Takenaka, S.; Oberdorster, G. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal. Toxicol.* **2009**, *21*, 55–60.
3. Nemmar, A.; Vanbilloen, H.; Hoylaerts, M.F.; Hoet, P.H.; Verbruggen, A.; Nemery, B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *164*, 1665–1668.
4. Oberdorster, G.; Oberdorster, E.; Oberdorster, J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839.

5. Lam, C.W.; James, J.T.; McCluskey, R.; Hunter, R.L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2004**, *77*, 126–134.
6. Ho, C.C.; Chang, H.; Tsai, H.T.; Tsai, M.H.; Yang, C.S.; Ling, Y.C.; Lin, P. Quantum dot 705, a cadmium-based nanoparticle, induces persistent inflammation and granuloma formation in the mouse lung. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 105–115.
7. Mercer, R.R.; Hubbs, A.F.; Scabilloni, J.F.; Wang, L.; Battelli, L.A.; Friend, S.; Castranova, V.; Porter, D.W. Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, doi:10.1186/1743-8977-8-21.
8. Murphy, F.A.; Poland, C.A.; Duffin, R.; Al-Jamal, K.T.; Ali-Boucetta, H.; Nunes, A.; Byrne, F.; Prina-Mello, A.; Volkov, Y.; Li, S.; *et al.* Length-dependent retention of carbon nanotubes in the pleural space of mice initiates sustained inflammation and progressive fibrosis on the parietal pleura. *Am. J. Pathol.* **2011**, *178*, 2587–2600.
9. Park, E.J.; Yoon, J.; Choi, K.; Yi, J.; Park, K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology* **2009**, *260*, 37–46.
10. Tabet, L.; Bussy, C.; Setyan, A.; Simon-Deckers, A.; Rossi, M.J.; Boczkowski, J.; Lanone, S. Coating carbon nanotubes with a polystyrene-based polymer protects against pulmonary toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 1–13.
11. Tada, Y.; Yano, N.; Takahashi, H.; Yuzawa, K.; Ando, H.; Kubo, Y.; Nagasawa, A.; Ogata, A.; Nakae, D. Acute phase pulmonary responses to a single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in fischer 344 rats. *J. Toxicol. Pathol.* **2012**, *25*, 233–239.
12. Coccini, T.; Barni, S.; Vaccarone, R.; Mustarelli, P.; Manzo, L.; Roda, E. Pulmonary toxicity of instilled cadmium-doped silica nanoparticles during acute and subacute stages in rats. *Histol. Histopathol.* **2013**, *28*, 195–209.
13. Tada, Y.; Yano, N.; Takahashi, H.; Yuzawa, K.; Ando, H.; Kubo, Y.; Nagasawa, A.; Inomata, A.; Ogata, A.; Nakae, D. Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles for 52 weeks in fischer 344 rats. *J. Toxicol. Pathol.* **2013**, *26*, 393–403.
14. Crouzier, D.; Follot, S.; Gentilhomme, E.; Flahaut, E.; Arnaud, R.; Dabouis, V.; Castellarin, C.; Debouzy, J.C. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung. *Toxicology* **2010**, *272*, 39–45.
15. Lam, C.W.; James, J.T.; McCluskey, R.; Arepalli, S.; Hunter, R.L. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.* **2006**, *36*, 189–217.
16. Shvedova, A.A.; Kisin, E.R.; Mercer, R.; Murray, A.R.; Johnson, V.J.; Potapovich, A.I.; Tyurina, Y.Y.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Schwegler-Berry, D.; *et al.* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2005**, *289*, L698–L708.
17. Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J.F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J.B.; Lison, D. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 221–231.

18. Chen, H.W.; Su, S.F.; Chien, C.T.; Lin, W.H.; Yu, S.L.; Chou, C.C.; Chen, J.J.; Yang, P.C. Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2393–2395.
19. Zhu, M.T.; Feng, W.Y.; Wang, Y.; Wang, B.; Wang, M.; Ouyang, H.; Zhao, Y.L.; Chai, Z.F. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2009**, *107*, 342–351.
20. Mossman, B.T.; Shukla, A.; Heintz, N.H.; Verschraegen, C.F.; Thomas, A.; Hassan, R. New insights into understanding the mechanisms, pathogenesis, and management of malignant mesotheliomas. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 1065–1077.
21. Donaldson, K.; Murphy, F.A.; Duffin, R.; Poland, C.A. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: A review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, doi:10.1186/1743-8977-7-5.
22. Castranova, V.; Schulte, P.A.; Zumwalde, R.D. Occupational nanosafety considerations for carbon nanotubes and carbon nanofibers. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 642–649.
23. Donaldson, K.; Poland, C.A.; Murphy, F.A.; Macfarlane, M.; Chernova, T.; Schinwald, A. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos—Similarities and differences. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 2078–2086.
24. Xu, J.; Futakuchi, M.; Shimizu, H.; Alexander, D.B.; Yanagihara, K.; Fukamachi, K.; Suzui, M.; Kanno, J.; Hirose, A.; Ogata, A.; *et al.* Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci.* **2012**, *103*, 2045–2050.
25. Glista-Baker, E.E.; Taylor, A.J.; Sayers, B.C.; Thompson, E.A.; Bonner, J.C. Nickel nanoparticles cause exaggerated lung and airway remodeling in mice lacking the T-box transcription factor, TBX21 (T-bet). *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, 7–22.
26. Ryman-Rasmussen, J.P.; Tewksbury, E.W.; Moss, O.R.; Cesta, M.F.; Wong, B.A.; Bonner, J.C. Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2009**, *40*, 349–358.
27. Inoue, K.; Koike, E.; Yanagisawa, R.; Hirano, S.; Nishikawa, M.; Takano, H. Effects of multi-walled carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *237*, 306–316.
28. Cesta, M.F.; Ryman-Rasmussen, J.P.; Wallace, D.G.; Masinde, T.; Hurlburt, G.; Taylor, A.J.; Bonner, J.C. Bacterial lipopolysaccharide enhances PDGF signaling and pulmonary fibrosis in rats exposed to carbon nanotubes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2010**, *43*, 142–151.
29. Shvedova, A.A.; Fabisiak, J.P.; Kisin, E.R.; Murray, A.R.; Roberts, J.R.; Tyurina, Y.Y.; Antonini, J.M.; Feng, W.H.; Kommineni, C.; Reynolds, J.; *et al.* Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2008**, *38*, 579–590.

30. Jonasson, S.; Gustafsson, A.; Koch, B.; Bucht, A. Inhalation exposure of nano-scaled titanium dioxide (TiO₂) particles alters the inflammatory responses in asthmatic mice. *Inhal. Toxicol.* **2013**, *25*, 179–191.
31. Jang, S.; Park, J.W.; Cha, H.R.; Jung, S.Y.; Lee, J.E.; Jung, S.S.; Kim, J.O.; Kim, S.Y.; Lee, C.S.; Park, H.S. Silver nanoparticles modify VEGF signaling pathway and mucus hypersecretion in allergic airway inflammation. *Int. J. Nanomed.* **2012**, *7*, 1329–1343.
32. Scarino, A.; Noel, A.; Renzi, P.M.; Cloutier, Y.; Vincent, R.; Truchon, G.; Tardif, R.; Charbonneau, M. Impact of emerging pollutants on pulmonary inflammation in asthmatic rats: Ethanol vapors and agglomerated TiO₂ nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* **2012**, *24*, 528–538.
33. Shvedova, A.A.; Pietroiusti, A.; Fadeel, B.; Kagan, V.E. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *261*, 121–133.
34. Ayres, J.G.; Borm, P.; Cassee, F.R.; Castranova, V.; Donaldson, K.; Ghio, A.; Harrison, R.M.; Hider, R.; Kelly, F.; Kooter, I.M.; *et al.* Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential—A workshop report and consensus statement. *Inhal. Toxicol.* **2008**, *20*, 75–99.
35. Li, J.G.; Li, W.X.; Xu, J.Y.; Cai, X.Q.; Liu, R.L.; Li, Y.J.; Zhao, Q.F.; Li, Q.N. Comparative study of pathological lesions induced by multiwalled carbon nanotubes in lungs of mice by intratracheal instillation and inhalation. *Environ. Toxicol.* **2007**, *22*, 415–421.
36. Noel, A.; Maghni, K.; Cloutier, Y.; Dion, C.; Wilkinson, K.J.; Halle, S.; Tardif, R.; Truchon, G. Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs. *Toxicol. Lett.* **2012**, *214*, 109–119.
37. Park, E.J.; Kim, H.; Kim, Y.; Yi, J.; Choi, K.; Park, K. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice. *Toxicology* **2010**, *275*, 65–71.
38. Sarkar, A.; Ghosh, M.; Sil, P.C. Nanotoxicity: Oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2014**, *14*, 730–743.
39. De Angelis, I.; Barone, F.; Zijno, A.; Bizzarri, L.; Russo, M.T.; Pozzi, R.; Franchini, F.; Giudetti, G.; Ubaldi, C.; Ponti, J.; *et al.* Comparative study of ZnO and TiO₂ nanoparticles: Physicochemical characterisation and toxicological effects on human colon carcinoma cells. *Nanotoxicology* **2013**, *7*, 1361–1372.
40. Foldbjerg, R.; Dang, D.A.; Autrup, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 743–750.
41. Shvedova, A.A.; Kisin, E.R.; Murray, A.R.; Gorelik, O.; Arepalli, S.; Castranova, V.; Young, S.H.; Gao, F.; Tyurina, Y.Y.; Oury, T.D.; *et al.* Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *221*, 339–348.

42. Bhattacharjee, S.; de Haan, L.H.; Evers, N.M.; Jiang, X.; Marcelis, A.T.; Zuilhof, H.; Rietjens, I.M.; Alink, G.M. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, doi:10.1186/1743-8977-7-25.
43. Li, J.; Li, L.; Chen, H.; Chang, Q.; Liu, X.; Wu, Y.; Wei, C.; Li, R.; Kwan, J.K.; Yeung, K.L.; *et al.* Application of vitamin E to antagonize SWCNTs-induced exacerbation of allergic asthma. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, doi:10.1038/srep04275.
44. Shvedova, A.A.; Kisin, E.R.; Murray, A.R.; Kommineni, C.; Castranova, V.; Fadeel, B.; Kagan, V.E. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of nadph oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *231*, 235–240.
45. Aalapathi, S.; Ganapathy, S.; Manapuram, S.; Anumolu, G.; Prakya, B.M. Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in cd1 mice. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 786–798.
46. Baisch, B.L.; Corson, N.M.; Wade-Mercer, P.; Gelein, R.; Kennell, A.J.; Oberdorster, G.; Elder, A. Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: The effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, doi:10.1186/1743-8977-11-5
47. Brown, D.M.; Kanase, N.; Gaiser, B.; Johnston, H.; Stone, V. Inflammation and gene expression in the rat lung after instillation of silica nanoparticles: Effect of size, dispersion medium and particle surface charge. *Toxicol. Lett.* **2014**, *224*, 147–156.
48. Braakhuis, H.M.; Park, M.V.; Gosens, I.; De Jong, W.H.; Cassee, F.R. Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* **2014**, *11*, doi:10.1186/1743-8977-11-18.
49. Di, P.Y.; Tkach, A.V.; Yanamala, N.; Stanley, S.; Gao, S.; Shurin, M.R.; Kisin, E.R.; Kagan, V.E.; Shvedova, A.A. Dual acute proinflammatory and antifibrotic pulmonary effects of short palate, lung, and nasal epithelium clone-1 after exposure to carbon nanotubes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *49*, 759–767.
50. Blum, J.L.; Rosenblum, L.K.; Grunig, G.; Beasley, M.B.; Xiong, J.Q.; Zelikoff, J.T. Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model. *Inhal. Toxicol.* **2014**, *26*, 48–58.
51. Lee, J.K.; Sayers, B.C.; Chun, K.S.; Lao, H.C.; Shipley-Phillips, J.K.; Bonner, J.C.; Langenbach, R. Multi-walled carbon nanotubes induce COX-2 and iNOS expression via MAP kinase-dependent and -independent mechanisms in mouse RAW264.7 macrophages. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*, doi:10.1186/1743-8977-9-14.
52. Armand, L.; Dagouassat, M.; Belade, E.; Simon-Deckers, A.; Le Gouvello, S.; Tharabat, C.; Duprez, C.; Andujar, P.; Pairen, J.C.; Boczkowski, J.; *et al.* Titanium dioxide nanoparticles induce matrix metalloprotease 1 in human pulmonary fibroblasts partly via an interleukin-1beta-dependent mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *48*, 354–363.

53. Abbott Chalew, T.E.; Schwab, K.J. Toxicity of commercially available engineered nanoparticles to Caco-2 and SW480 human intestinal epithelial cells. *Cell Biol. Toxicol.* **2013**, *29*, 101–116.
54. Murphy, F.A.; Schinwald, A.; Poland, C.A.; Donaldson, K. The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: Interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*, doi:10.1186/1743-8977-9-8.
55. Donaldson, K.; Poland, C.A.; Schins, R.P. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 414–420.
56. Hubbs, A.F.; Mercer, R.R.; Benkovic, S.A.; Harkema, J.; Sriram, K.; Schwegler-Berry, D.; Goravanahally, M.P.; Nurkiewicz, T.R.; Castranova, V.; Sargent, L.M. Nanotoxicology—A pathologist’s perspective. *Toxicol. Pathol.* **2011**, *39*, 301–324.
57. Kumar, A.; Dhawan, A. Genotoxic and carcinogenic potential of engineered nanoparticles: An update. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87*, 1883–1900.
58. Muller, J.; Decordier, I.; Hoet, P.H.; Lombaert, N.; Thomassen, L.; Huaux, F.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 427–433.
59. Trouiller, B.; Reliene, R.; Westbrook, A.; Solaimani, P.; Schiestl, R.H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability *in vivo* in mice. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8784–8789.
60. Hackenberg, S.; Scherzed, A.; Kessler, M.; Hummel, S.; Technau, A.; Froelich, K.; Ginzkey, C.; Koehler, C.; Hagen, R.; Kleinsasser, N. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicol. Lett.* **2011**, *201*, 27–33.
61. Di Virgilio, A.L.; Reigosa, M.; Arnal, P.M.; Fernández Lorenzo de Mele, M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J. Hazard Mater.* **2010**, *177*, 711–718.
62. An, H.; Liu, Q.; Ji, Q.; Jin, B. DNA binding and aggregation by carbon nanoparticles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *393*, 571–576.
63. Jin, P.; Chen, Y.; Zhang, S.B.; Chen, Z. Interactions between Al₁₂X (X = Al, C, N and P) nanoparticles and DNA nucleobases/base pairs: Implications for nanotoxicity. *J. Mol. Model.* **2012**, *18*, 559–568.
64. Kain, J.; Karlsson, H.L.; Möller, L. DNA damage induced by micro- and nanoparticles-interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis* **2012**, *27*, 491–500.
65. Baweja, L.; Gurbani, D.; Shanker, R.; Pandey, A.K.; Subramanian, V.; Dhawan, A. C60-fullerene binds with the ATP binding domain of human DNA topoisomerase II alpha. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7*, 177–178.
66. Gupta, S.K.; Baweja, L.; Gurbani, D.; Pandey, A.K.; Dhawan, A. Interaction of C60 fullerene with the proteins involved in DNA mismatch repair pathway. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2011**, *7*, 179–180.

67. Jugan, M.L.; Barillet, S.; Simon-Deckers, A.; Herlin-Boime, N.; Sauvaigo, S.; Douki, T.; Carriere, M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology* **2012**, *6*, 501–513.
68. Hackenberg, S.; Friehs, G.; Kessler, M.; Froelich, K.; Ginzkey, C.; Koehler, C.; Scherzed, A.; Burghartz, M.; Kleinsasser, N. Nanosized titanium dioxide particles do not induce DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* **2011**, *52*, 264–268.
69. Wurnitzer, U.; Herbold, B.; Voetz, M.; Ragot, J. Studies on the *in vitro* genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (mwcnt). *Toxicol. Lett.* **2009**, *186*, 160–165.
70. Guo, Y.Y.; Zhang, J.; Zheng, Y.F.; Yang, J.; Zhu, X.Q. Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Mutat. Res.* **2011**, *721*, 184–191.
71. Sharma, V.; Anderson, D.; Dhawan, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis* **2012**, *17*, 852–870.
72. Lynch, I.; Cedervall, T.; Lundqvist, M.; Cabaleiro-Lago, C.; Linse, S.; Dawson, K.A. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134–135*, 167–174.
73. Shannahan, J.H.; Lai, X.; Ke, P.C.; Podila, R.; Brown, J.M.; Witzmann, F.A. Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. *PLoS One* **2013**, *8*, e74001.
74. Podila, R.; Vedantam, P.; Ke, P.C.; Brown, J.M.; Rao, A.M. Evidences for charge transfer-induced conformational changes in carbon nanostructure-protein corona. *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces* **2012**, *116*, 22098–22103.
75. Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggard, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K.A.; Linse, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2050–2055.
76. Lundqvist, M.; Stigler, J.; Elia, G.; Lynch, I.; Cedervall, T.; Dawson, K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14265–14270.
77. Nel, A.E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E.M.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543–557.
78. Johnston, H.; Brown, D.; Kermanizadeh, A.; Gubbins, E.; Stone, V. Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications. *J. Control Release* **2012**, *164*, 307–313.

79. Ge, C.; Du, J.; Zhao, L.; Wang, L.; Liu, Y.; Li, D.; Yang, Y.; Zhou, R.; Zhao, Y.; Chai, Z.; *et al.* Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16968–16973.
80. Salvador-Morales, C.; Townsend, P.; Flahaut, E.; Venien-Bryan, C.; Vlandas, A.; Green, M.L.H.; Sim, R.B. Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes: Potential for damage to lung immune defense mechanisms. *Carbon* **2007**, *45*, 607–617.
81. Du, J.; Ge, C.; Liu, Y.; Bai, R.; Li, D.; Yang, Y.; Liao, L.; Chen, C. The interaction of serum proteins with carbon nanotubes depend on the physicochemical properties of nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 10102–10110.
82. Banerjee, V.; Das, K.P. Structure and functional properties of a multimeric protein alphas-crystallin adsorbed on silver nanoparticle surface. *Langmuir* **2014**, *30*, 4775–4783.
83. Zhang, B.; Xing, Y.; Li, Z.; Zhou, H.; Mu, Q.; Yan, B. Functionalized carbon nanotubes specifically bind to alpha-chymotrypsin's catalytic site and regulate its enzymatic function. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2280–2284.
84. Treuel, L.; Brandholt, S.; Maffre, P.; Wiegele, S.; Shang, L.; Nienhaus, G.U. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle-cell interactions. *ACS Nano* **2014**, *8*, 503–513.
85. Saptarshi, S.R.; Duschl, A.; Lopata, A.L. Interaction of nanoparticles with proteins: Relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J. Nanobiotechnol.* **2013**, *11*, 26–37.
86. Donaldson, K. Resolving the nanoparticles paradox. *Nanomed. Lond.* **2006**, *1*, 229–234.
87. Lanone, S.; Rogerieux, F.; Geys, J.; Dupont, A.; Maillot-Marechal, E.; Boczkowski, J.; Lacroix, G.; Hoet, P. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* **2009**, *6*, 14–25.
88. Tian, F.; Cui, D.; Schwarz, H.; Estrada, G.G.; Kobayashi, H. Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1202–1212.
89. Petkovic, J.; Zegura, B.; Stevanovic, M.; Drnovsek, N.; Uskokovic, D.; Novak, S.; Filipic, M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* **2011**, *5*, 341–353.
90. Bussy, C.; Pinault, M.; Cambedouzou, J.; Landry, M.J.; Jegou, P.; Mayne-L'hermite, M.; Launois, P.; Boczkowski, J.; Lanone, S. Critical role of surface chemical modifications induced by length shortening on multi-walled carbon nanotubes-induced toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* **2012**, *9*, doi:10.1186/1743-8977-9-46.
91. Kagan, V.E.; Tyurina, Y.Y.; Tyurin, V.A.; Konduru, N.V.; Potapovich, A.I.; Osipov, A.N.; Kisin, E.R.; Schwegler-Berry, D.; Mercer, R.; Castranova, V.; *et al.* Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: Role of iron. *Toxicol. Lett.* **2006**, *165*, 88–100.

92. Shvedova, A.A.; Castranova, V.; Kisin, E.R.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A.R.; Gandelsman, V.Z.; Maynard, A.; Baron, P. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2003**, *66*, 1909–1926.
93. Bussy, C.; Paineau, E.; Cambedouzou, J.; Brun, N.; Mory, C.; Fayard, B.; Salome, M.; Pinault, M.; Huard, M.; Belade, E.; *et al.* Intracellular fate of carbon nanotubes inside murine macrophages: Ph-dependent detachment of iron catalyst nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2013**, *10*, doi:10.1186/1743-8977-10-24.
94. Hamzeh, M.; Sunahara, G.I. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicol. In Vitro* **2013**, *27*, 864–873.
95. Patnaik, A. Structure and dynamics in self-organized C60 fullerenes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, *7*, 1111–1150.
96. Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **2008**, *132*, 27–42.
97. Ryter, S.W.; Nakahira, K.; Haspel, J.A.; Choi, A.M. Autophagy in pulmonary diseases. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 377–401.
98. Hayashi-Nishino, M.; Fujita, N.; Noda, T.; Yamaguchi, A.; Yoshimori, T.; Yamamoto, A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1433–1437.
99. Yla-Anttila, P.; Vihinen, H.; Jokitalo, E.; Eskelinen, E.L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **2009**, *5*, 1180–1185.
100. Hailey, D.W.; Rambold, A.S.; Satpute-Krishnan, P.; Mitra, K.; Sougrat, R.; Kim, P.K.; Lippincott-Schwartz, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **2010**, *141*, 656–667.
101. Geng, J.; Nair, U.; Yasumura-Yorimitsu, K.; Klionsky, D.J. Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 2257–2269.
102. Ravikumar, B.; Moreau, K.; Jahreiss, L.; Puri, C.; Rubinsztein, D.C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 747–757.
103. Burman, C.; Ktistakis, N.T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1302–1312.
104. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 107–132.
105. Fimia, G.M.; Stoykova, A.; Romagnoli, A.; Giunta, L.; Di Bartolomeo, S.; Nardacci, R.; Corazzari, M.; Fuoco, C.; Ucar, A.; Schwartz, P.; *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **2007**, *447*, 1121–1125.
106. Liang, C.; Feng, P.; Ku, B.; Dotan, I.; Canaani, D.; Oh, B.H.; Jung, J.U. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 688–699.

107. Pattingre, S.; Tassa, A.; Qu, X.; Garuti, R.; Liang, X.H.; Mizushima, N.; Packer, M.; Schneider, M.D.; Levine, B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **2005**, *122*, 927–939.
108. Takahashi, Y.; Coppola, D.; Matsushita, N.; Cualing, H.D.; Sun, M.; Sato, Y.; Liang, C.; Jung, J.U.; Cheng, J.Q.; Mulé, J.J.; *et al.* Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1142–1151.
109. Kuma, A.; Mizushima, N.; Ishihara, N.; Ohsumi, Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18619–18625.
110. Mizushima, N.; Kuma, A.; Kobayashi, Y.; Yamamoto, A.; Matsubae, M.; Takao, T.; Natsume, T.; Ohsumi, Y.; Yoshimori, T. Mouse Apg16l, a novel wd-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1679–1688.
111. Tanida, I.; Sou, Y.S.; Ezaki, J.; Minematsu-Ikeguchi, N.; Ueno, T.; Kominami, E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36268–36276.
112. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. Lc3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2503–2518.
113. Hanada, T.; Noda, N.N.; Satomi, Y.; Ichimura, Y.; Fujioka, Y.; Takao, T.; Inagaki, F.; Ohsumi, Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel e3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 37298–37302.
114. Fujita, N.; Itoh, T.; Omori, H.; Fukuda, M.; Noda, T.; Yoshimori, T. The Atg16l complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 2092–2100.
115. Jahreiss, L.; Menzies, F.M.; Rubinsztein, D.C. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **2008**, *9*, 574–587.
116. Kimura, S.; Noda, T.; Yoshimori, T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* **2008**, *33*, 109–122.
117. Ravikumar, B.; Acevedo-Arozena, A.; Imarisio, S.; Berger, Z.; Vacher, C.; O’Kane, C.J.; Brown, S.D.; Rubinsztein, D.C. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 771–776.
118. Webb, J.L.; Ravikumar, B.; Rubinsztein, D.C. Microtubule disruption inhibits autophagosome- lysosome fusion: Implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2541–2550.

119. Gutierrez, M.G.; Vazquez, C.L.; Munafo, D.B.; Zoppino, F.C.; Beron, W.; Rabinovitch, M.; Colombo, M.I. Autophagy induction favours the generation and maturation of the coxiella-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 981–993.
120. Jager, S.; Bucci, C.; Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E.; Saftig, P.; Eskelinen, E.L. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4837–4848.
121. Liang, C.; Lee, J.S.; Inn, K.S.; Gack, M.U.; Li, Q.; Roberts, E.A.; Vergne, I.; Deretic, V.; Feng, P.; Akazawa, C.; *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 776–787.
122. Renna, M.; Schaffner, C.; Winslow, A.R.; Menzies, F.M.; Peden, A.A.; Floto, R.A.; Rubinsztein, D.C. Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 snare complex. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 469–482.
123. Tanaka, Y.; Guhde, G.; Suter, A.; Eskelinen, E.L.; Hartmann, D.; Lullmann-Rauch, R.; Janssen, P.M.; Blanz, J.; von Figura, K.; Saftig, P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **2000**, *406*, 902–906.
124. Tanida, I.; Minematsu-Ikeguchi, N.; Ueno, T.; Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **2005**, *1*, 84–91.
125. Berg, T.O.; Fengsrud, M.; Stromhaug, P.E.; Berg, T.; Seglen, P.O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21883–21892.
126. Lee, J.A.; Beigneux, A.; Ahmad, S.T.; Young, S.G.; Gao, F.B. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 1561–1567.
127. Rusten, T.E.; Stenmark, H. How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2179–2183.
128. Klionsky, D.J.; Abdalla, F.C.; Abeliovich, H.; Abraham, R.T.; Acevedo-Arozena, A.; Adeli, K.; Agholme, L.; Agnello, M.; Agostinis, P.; Aguirre-Ghiso, J.A.; *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **2012**, *8*, 445–544.
129. Mizushima, N. Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2491–2502.
130. Mizushima, N.; Yoshimori, T.; Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **2010**, *140*, 313–326.
131. Bjorkoy, G.; Lamark, T.; Pankiv, S.; Overvatn, A.; Brech, A.; Johansen, T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* **2009**, *452*, 181–197.
132. Mizushima, N. Autophagy: Process and function. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2861–2873.
133. Chen, Z.H.; Kim, H.P.; Sciurba, F.C.; Lee, S.J.; Feghali-Bostwick, C.; Stolz, D.B.; Dhir, R.; Landreneau, R.J.; Schuchert, M.J.; Yousem, S.A.; *et al.* Egr-1 regulates autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* **2008**, *3*, e3316.

134. Hwang, J.W.; Chung, S.; Sundar, I.K.; Yao, H.; Arunachalam, G.; McBurney, M.W.; Rahman, I. Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: Implication in pathogenesis of COPD. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *500*, 203–209.
135. Kim, H.P.; Wang, X.; Chen, Z.H.; Lee, S.J.; Huang, M.H.; Wang, Y.; Ryter, S.W.; Choi, A.M. Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: Protective role of heme oxygenase-1. *Autophagy* **2008**, *4*, 887–895.
136. Chen, Z.H.; Lam, H.C.; Jin, Y.; Kim, H.P.; Cao, J.; Lee, S.J.; Ifedigbo, E.; Parameswaran, H.; Ryter, S.W.; Choi, A.M. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18880–18885.
137. Monick, M.M.; Powers, L.S.; Walters, K.; Lavan, N.; Zhang, M.; Gerke, A.; Hansdottir, S.; Hunninghake, G.W. Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 5425–5435.
138. Luciani, A.; Villella, V.R.; Esposito, S.; Brunetti-Pierri, N.; Medina, D.; Settembre, C.; Gavina, M.; Pulze, L.; Giardino, I.; Pettoello-Mantovani, M.; *et al.* Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 863–875.
139. Abdulrahman, B.A.; Khweek, A.A.; Akhter, A.; Caution, K.; Kotrange, S.; Abdelaziz, D.H.; Newland, C.; Rosales-Reyes, R.; Kopp, B.; McCoy, K.; *et al.* Autophagy stimulation by rapamycin suppresses lung inflammation and infection by burkholderia cenocepacia in a model of cystic fibrosis. *Autophagy* **2011**, *7*, 1359–1370.
140. Lee, S.J.; Smith, A.; Guo, L.; Alastalo, T.P.; Li, M.; Sawada, H.; Liu, X.; Chen, Z.H.; Ifedigbo, E.; Jin, Y.; *et al.* Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *183*, 649–658.
141. Haspel, J.A.; Choi, A.M. Autophagy: A core cellular process with emerging links to pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *184*, 1237–1246.
142. Mizumura, K.; Cloonan, S.M.; Haspel, J.A.; Choi, A.M. The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases. *Chest* **2012**, *142*, 1289–1299.
143. Ryter, S.W. Bile pigments in pulmonary and vascular disease. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 39–46.
144. Arico, S.; Petiot, A.; Bauvy, C.; Dubbelhuis, P.F.; Meijer, A.J.; Codogno, P.; Ogier-Denis, E. The tumor suppressor pten positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35243–35246.
145. Liang, X.H.; Jackson, S.; Seaman, M.; Brown, K.; Kempkes, B.; Hibshoosh, H.; Levine, B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by Beclin 1. *Nature* **1999**, *402*, 672–676.
146. Qu, X.; Yu, J.; Bhagat, G.; Furuya, N.; Hibshoosh, H.; Troxel, A.; Rosen, J.; Eskelinen, E.L.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; *et al.* Promotion of tumorigenesis by

- heterozygous disruption of the Beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1809–1820.
147. Takamura, A.; Komatsu, M.; Hara, T.; Sakamoto, A.; Kishi, C.; Waguri, S.; Eishi, Y.; Hino, O.; Tanaka, K.; Mizushima, N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 795–800.
148. Karantza-Wadsworth, V.; Patel, S.; Kravchuk, O.; Chen, G.; Mathew, R.; Jin, S.; White, E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1621–1635.
149. Levine, B. Cell biology: Autophagy and cancer. *Nature* **2007**, *446*, 745–747.
150. Schroder, K.; Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell* **2010**, *140*, 821–832.
151. Nakahira, K.; Haspel, J.A.; Rathinam, V.A.; Lee, S.J.; Dolinay, T.; Lam, H.C.; Englert, J.A.; Rabinovitch, M.; Cernadas, M.; Kim, H.P.; *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 222–230.
152. Zhou, R.; Yazdi, A.S.; Menu, P.; Tschopp, J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **2011**, *469*, 221–225.
153. Harris, J.; Hartman, M.; Roche, C.; Zeng, S.G.; O’Shea, A.; Sharp, F.A.; Lambe, E.M.; Creagh, E.M.; Golenbock, D.T.; Tschopp, J.; *et al.* Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 9587–9597.
154. Shi, C.S.; Shenderov, K.; Huang, N.N.; Kabat, J.; Abu-Asab, M.; Fitzgerald, K.A.; Sher, A.; Kehrl, J.H. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 255–263.
155. Levine, B.; Mizushima, N.; Virgin, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **2011**, *469*, 323–335.
156. Saitoh, T.; Fujita, N.; Jang, M.H.; Uematsu, S.; Yang, B.G.; Satoh, T.; Omori, H.; Noda, T.; Yamamoto, N.; Komatsu, M.; *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16l1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* **2008**, *456*, 264–268.
157. Ling, J.; Kang, Y.; Zhao, R.; Xia, Q.; Lee, D.F.; Chang, Z.; Li, J.; Peng, B.; Fleming, J.B.; Wang, H.; *et al.* KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 105–120.
158. Mathew, R.; Karp, C.M.; Beaudoin, B.; Vuong, N.; Chen, G.; Chen, H.Y.; Bray, K.; Reddy, A.; Bhanot, G.; Gelinas, C.; *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **2009**, *137*, 1062–1075.
159. Moscat, J.; Diaz-Meco, M.T. P62: A versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 230–236.
160. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **2007**, *447*, 661–678.

161. Henckaerts, L.; Cleynen, I.; Brinar, M.; John, J.M.; Van Steen, K.; Rutgeerts, P.; Vermeire, S. Genetic variation in the autophagy gene ULK1 and risk of crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2011**, *17*, 1392–1397.
162. Chen, Y.; Azad, M.B.; Gibson, S.B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 1040–1052.
163. Scherz-Shouval, R.; Shvets, E.; Fass, E.; Shorer, H.; Gil, L.; Elazar, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **2007**, *26* 1749–1760.
164. Zhang, H.; Kong, X.; Kang, J.; Su, J.; Li, Y.; Zhong, J.; Sun, L. Oxidative stress induces parallel autophagy and mitochondria dysfunction in human glioma U251 cells. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2009**, *110*, 376–388.
165. Farombi, E.O. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: Protective role of free radical scavengers. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, *22*, 159–167.
166. Hara, T.; Nakamura, K.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakahara, Y.; Suzuki-Migishima, R.; Yokoyama, M.; Mishima, K.; Saito, I.; Okano, H.; *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **2006**, *441*, 885–889.
167. Park, B.C.; Park, S.H.; Paek, S.H.; Park, S.Y.; Kwak, M.K.; Choi, H.G.; Yong, C.S.; Yoo, B.K.; Kim, J.A. Chloroquine-induced nitric oxide increase and cell death is dependent on cellular GSH depletion in A172 human glioblastoma cells. *Toxicol. Lett.* **2008**, *178*, 52–60.
168. Park, J.; Choi, K.; Jeong, E.; Kwon, D.; Benveniste, E.N.; Choi, C. Reactive oxygen species mediate chloroquine-induced expression of chemokines by human astroglial cells. *Glia* **2004**, *47*, 9–20.
169. Yamasaki, R.; Zhang, J.; Koshiishi, I.; Sastradipura Suniarti, D.F.; Wu, Z.; Peters, C.; Schwake, M.; Uchiyama, Y.; Kira, J.; Saftig, P.; *et al.* Involvement of lysosomal storage-induced p38 map kinase activation in the overproduction of nitric oxide by microglia in cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **2007**, *35*, 573–584.
170. Lemasters, J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* **2005**, *8*, 3–5.
171. Kurihara, Y.; Kanki, T.; Aoki, Y.; Hirota, Y.; Saigusa, T.; Uchiumi, T.; Kang, D. Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3265–3272.
172. Kaushik, S.; Cuervo, A.M. Autophagy as a cell-repair mechanism: Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27*, 444–454.
173. Kiffin, R.; Christian, C.; Knecht, E.; Cuervo, A.M. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 4829–4840.
174. Jain, A.; Lamark, T.; Sjøttem, E.; Larsen, K.B.; Awuh, J.A.; Overvatn, A.; McMahon, M.; Hayes, J.D.; Johansen, T. P62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing

- antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22576–22591.
175. Komatsu, M.; Kurokawa, H.; Waguri, S.; Taguchi, K.; Kobayashi, A.; Ichimura, Y.; Sou, Y.S.; Ueno, I.; Sakamoto, A.; Tong, K.I.; *et al.* The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor NRF2 through inactivation of KEAP1. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 213–223.
176. Li, C.; Liu, H.; Sun, Y.; Wang, H.; Guo, F.; Rao, S.; Deng, J.; Zhang, Y.; Miao, Y.; Guo, C.; *et al.* Pamam nanoparticles promote acute lung injury by inducing autophagic cell death through the Akt-TSC2-mTOR signaling pathway. *J. Mol. Cell Biol.* **2009**, *1*, 37–45.
177. Lee, Y.H.; Cheng, F.Y.; Chiu, H.W.; Tsai, J.C.; Fang, C.Y.; Chen, C.W.; Wang, Y.J. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4706–4715.
178. Park, E.J.; Umh, H.N.; Kim, S.W.; Cho, M.H.; Kim, J.H.; Kim, Y. ERK pathway is activated in bare-FeNPs-induced autophagy. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 323–336.
179. Chen, G.Y.; Yang, H.J.; Lu, C.H.; Chao, Y.C.; Hwang, S.M.; Chen, C.L.; Lo, K.W.; Sung, L.Y.; Luo, W.Y.; Tuan, H.Y.; *et al.* Simultaneous induction of autophagy and toll-like receptor signaling pathways by graphene oxide. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6559–6569.
180. Verma, N.K.; Conroy, J.; Lyons, P.E.; Coleman, J.; O’Sullivan, M.P.; Kornfeld, H.; Kelleher, D.; Volkov, Y. Autophagy induction by silver nanowires: A new aspect in the biocompatibility assessment of nanocomposite thin films. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *264*, 451–461.
181. Roy, R.; Singh, S.K.; Chauhan, L.K.; Das, M.; Tripathi, A.; Dwivedi, P.D. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition. *Toxicol. Lett.* **2014**, *227*, 29–40.
182. Khan, M.I.; Mohammad, A.; Patil, G.; Naqvi, S.A.; Chauhan, L.K.; Ahmad, I. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1477–1488.
183. Ma, X.; Wu, Y.; Jin, S.; Tian, Y.; Zhang, X.; Zhao, Y.; Yu, L.; Liang, X.J. Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8629–8639.
184. Orecna, M.; De Paoli, S.H.; Janouskova, O.; Tegegn, T.Z.; Filipova, M.; Bonevich, J.E.; Holada, K.; Simak, J. Toxicity of carboxylated carbon nanotubes in endothelial cells is attenuated by stimulation of the autophagic flux with the release of nanomaterial in autophagic vesicles. *Nanomedicine* **2014**, doi:10.1016/j.nano.2014.02.001.
185. Wan, B.; Wang, Z.X.; Lv, Q.Y.; Dong, P.X.; Zhao, L.X.; Yang, Y.; Guo, L.H. Single-walled carbon nanotubes and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Toxicol. Lett.* **2013**, *221*, 118–127.
186. Sun, T.; Yan, Y.; Zhao, Y.; Guo, F.; Jiang, C. Copper oxide nanoparticles induce autophagic cell death in A549 cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e43442.

187. Li, J.J.; Hartono, D.; Ong, C.N.; Bay, B.H.; Yung, L.Y. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5996–6003.
188. Nowak, J.S.; Mehn, D.; Nativo, P.; Garcia, C.P.; Gioria, S.; Ojea-Jimenez, I.; Gilliland, D.; Rossi, F. Silica nanoparticle uptake induces survival mechanism in A549 cells by the activation of autophagy but not apoptosis. *Toxicol. Lett.* **2013**, *224*, 84–92.
189. Yamawaki, H.; Iwai, N. Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2006**, *290*, 1495–1502.
190. Eidi, H.; Joubert, O.; Nemos, C.; Grandemange, S.; Mograbi, B.; Foliguet, B.; Tournebize, J.; Maincent, P.; Le Faou, A.; Aboukhamis, I.; *et al.* Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int. J. Pharm.* **2012**, *422*, 495–503.
191. Tsukahara, T.; Matsuda, Y.; Usui, Y.; Haniu, H. Highly purified, multi-wall carbon nanotubes induce light-chain 3B expression in human lung cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *440*, 348–353.
192. Monastyrska, I.; Rieter, E.; Klionsky, D.J.; Reggiori, F. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **2009**, *84*, 431–448.
193. Aplin, A.; Jasionowski, T.; Tuttle, D.L.; Lenk, S.E.; Dunn, W.A., Jr. Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J. Cell. Physiol.* **1992**, *152*, 458–466.
194. Seglen, P.O.; Berg, T.O.; Blankson, H.; Fengsrud, M.; Holen, I.; Stromhaug, P.E. Structural aspects of autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *389*, 103–111.
195. Kochl, R.; Hu, X.W.; Chan, E.Y.; Tooze, S.A. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* **2006**, *7*, 129–145.
196. Lee, J.Y.; Koga, H.; Kawaguchi, Y.; Tang, W.; Wong, E.; Gao, Y.S.; Pandey, U.B.; Kaushik, S.; Tresse, E.; Lu, J.; *et al.* HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin- selective quality-control autophagy. *EMBO J.* **2010**, *29*, 969–980.
197. Choudhury, D.; Xavier, P.L.; Chaudhari, K.; John, R.; Dasgupta, A.K.; Pradeep, T.; Chakrabarti, G. Unprecedented inhibition of tubulin polymerization directed by gold nanoparticles inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Nanoscale* **2013**, *5*, 4476–4489.
198. Gheshlaghi, Z.N.; Riazi, G.H.; Ahmadian, S.; Ghafari, M.; Mahinpour, R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **2008**, *40*, 777–782.
199. Ratnikova, T.A.; Govindan, P.N.; Salonen, E.; Ke, P.C. *In vitro* polymerization of microtubules with a fullerene derivative. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6306–6314.
200. Shams, H.; Holt, B.D.; Mahboobi, S.H.; Jahed, Z.; Islam, M.F.; Dahl, K.N.; Mofrad, M.R. Actin reorganization through dynamic interactions with single-wall carbon nanotubes. *ACS Nano* **2014**, *8*, 188–197.
201. Okoturo-Evans, O.; Dybowska, A.; Valsami-Jones, E.; Cupitt, J.; Gierula, M.; Boobis, A.R.; Edwards, R.J. Elucidation of toxicity pathways in lung epithelial cells induced by silicon dioxide nanoparticles. *PLoS One* **2013**, *8*, e72633.

202. Pernodet, N.; Fang, X.; Sun, Y.; Bakhtina, A.; Ramakrishnan, A.; Sokolov, J.; Ulman, A.; Rafailovich, M. Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* **2006**, *2*, 766–773.
203. Mironava, T.; Hadjiargyrou, M.; Simon, M.; Jurukovski, V.; Rafailovich, M.H. Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: Effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 120–137.
204. Pisanic, T.R.; Blackwell, J.D.; Shubayev, V.I.; Finones, R.R.; Jin, S. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2572–2581.
205. Dadras, A.; Riazi, G.H.; Afrasiabi, A.; Naghshineh, A.; Ghalandari, B.; Mokhtari, F. *In vitro* study on the alterations of brain tubulin structure and assembly affected by magnetite nanoparticles. *JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 357–369.
206. Wu, X.; Tan, Y.; Mao, H.; Zhang, M. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 385–399.
207. Soenen, S.J.; Nuytten, N.; De Meyer, S.F.; De Smedt, S.C.; De Cuyper, M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* **2010**, *6*, 832–842.
208. Johnson-Lyles, D.N.; Peifley, K.; Lockett, S.; Neun, B.W.; Hansen, M.; Clogston, J.; Stern, S.T.; McNeil, S.E. Fullerenol cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *248*, 249–258.
209. Sohaebuddin, S.K.; Thevenot, P.T.; Baker, D.; Eaton, J.W.; Tang, L. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 22. doi:10.1186/1743-8977-7-22.
210. Thomas, T.P.; Majoros, I.; Kotlyar, A.; Mullen, D.; Holl, M.M.; Baker, J.R., Jr. Cationic poly(amidoamine) dendrimer induces lysosomal apoptotic pathway at therapeutically relevant concentrations. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3207–3214.
211. Baltazar, G.C.; Guha, S.; Lu, W.; Lim, J.; Boesze-Battaglia, K.; Laties, A.M.; Tyagi, P.; Kompella, U.B.; Mitchell, C.H. Acidic nanoparticles are trafficked to lysosomes and restore an acidic lysosomal pH and degradative function to compromised ARPE-19 cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e49635.
212. Hussain, S.; Thomassen, L.C.; Ferecatu, I.; Borot, M.C.; Andreau, K.; Martens, J.A.; Fleury, J.; Baeza-Squiban, A.; Marano, F.; Boland, S. Carbon black and titanium dioxide nanoparticles elicit distinct apoptotic pathways in bronchial epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* **2010**, *7*, 10–26.
213. Jin, C.Y.; Zhu, B.S.; Wang, X.F.; Lu, Q.H. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1871–1877.
214. Cho, W.S.; Duffin, R.; Howie, S.E.; Scotton, C.J.; Wallace, W.A.; Macnee, W.; Bradley, M.; Megson, I.L.; Donaldson, K. Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 27–42.

215. Hamilton, R.F.; Wu, N.; Porter, D.; Buford, M.; Wolfarth, M.; Holian, A. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. *Part. Fibre Toxicol.* **2009**, *6*, doi:10.1186/1743-8977-6-35.
216. Lunov, O.; Syrovets, T.; Loos, C.; Nienhaus, G.U.; Mailander, V.; Landfester, K.; Rouis, M.; Simmet, T. Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages. *ACS Nano* **2011**, *5*, 9648–9657.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Annexe 2

Publication 2 : Exposure to welding fumes and lower airway infection with *Streptococcus pneumoniae*

Exposure to welding fumes and lower airway infection with *Streptococcus pneumoniae*

Reetika Suri, PhD,^a Jimstan Periselneris, MB BS,^b Sophie Lanone, PhD,^c Patti C. Zeidler-Erdely, PhD,^d Geoffrey Melton, BSc,^e Keith T. Palmer, MD,^f Pascal Andujar, MD,^c James M. Antonini, PhD,^d Vanessa Cohignac, MSc,^c Aaron Erdely, PhD,^d Ricardo J. Jose, MB BS,^b Ian Mudway, PhD,^g Jeremy Brown, MD,^b and Jonathan Grigg, MD^a

London, Cambridge, and Southampton, United Kingdom, Creteil, France, and Morgantown, WV

Background: Welders are at increased risk of pneumococcal pneumonia. The mechanism for this association is not known. The capacity of pneumococci to adhere to and infect lower airway cells is mediated by host-expressed platelet-activating factor receptor (PAFR). **Objective:** We sought to assess the effect of mild steel welding fumes (MS-WF) on PAFR-dependent pneumococcal adhesion and infection to human airway cells in vitro and on pneumococcal airway infection in a mouse model.

Methods: The oxidative potential of MS-WF was assessed by their capacity to reduce antioxidants in vitro. Pneumococcal adhesion and infection of A549, BEAS-2B, and primary human bronchial airway cells were assessed by means of quantitative bacterial culture and expressed as colony-forming units (CFU). After intranasal instillation of MS-WF, mice were infected with *Streptococcus pneumoniae*, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung CFU values were determined. PAFR protein levels were assessed by using immunofluorescence and immunohistochemistry, and PAFR mRNA expression was assessed by using quantitative PCR. PAFR was blocked by CV-3988, and oxidative stress was attenuated by N-acetylcysteine.

Results: MS-WF exhibited high oxidative potential. In A549 and BEAS-2B cells MS-WF increased pneumococcal adhesion and infection and PAFR protein expression. Both CV-3988 and N-acetylcysteine reduced MS-WF-stimulated pneumococcal adhesion and infection of airway cells. MS-WF increased mouse lung PAFR mRNA expression and increased BALF and lung

pneumococcal CFU values. In MS-WF-exposed mice CV-3988 reduced BALF CFU values.

Conclusions: Hypersusceptibility of welders to pneumococcal pneumonia is in part mediated by the capacity of welding fumes to increase PAFR-dependent pneumococcal adhesion and infection of lower airway cells. (J Allergy Clin Immunol 2015;nnn:nnn-nnn.)

Keywords: Occupational disease, welding fumes, platelet-activating factor receptor, *Streptococcus pneumoniae*, pneumonia, bacterial adhesion and infection

Occupational data from England and Wales for 1970 to 1972 report there were 66 deaths among welders compared with 42 expected deaths.¹ Similar data for 1990 to 2000 suggest that excess deaths among welders are due to pneumonias other than bronchopneumonia, principally lobar pneumonia, and are present in other occupations associated with exposure to metal fumes.² Hypersusceptibility to pneumonia appears to be reversible because excess deaths are limited to welders of less than the normal retirement age,² and a recent United Kingdom (UK) case-control study found that hospital admissions for community-acquired pneumococcal pneumonia in working-age men were associated with occupational exposure to metal fumes in the past year but not in earlier periods.³ Increased risk of pneumonia in welders has also been found outside the UK. For example, in a cohort of more than 30,000 Swedish construction workers with exposure to metal fumes, Toren et al⁴ reported that mortality from lobar pneumonia was 3.7-fold higher and mortality from pneumococcal pneumonia was 5.8-fold higher relative to their peers. By contrast, deaths from pneumonia in retired metal workers were only marginally increased.⁴ Although these findings suggest that inhalation of welding fumes (WF) increases the risk of pneumococcal infection, the high prevalence of other exposures in welders associated with increased risk of pneumococcal disease, such as smoking,^{5,6} and the lack of a biologically plausible mechanism result in uncertainties about causality. However, animal studies reporting that WF impair pulmonary clearance of *Listeria monocytogenes*⁷⁻⁹ suggest that WF have the potential to adversely affect the pulmonary innate immune system.

Adherence of pneumococci to lower airway cells is a first step in the development of airway infection leading to pneumonia.¹⁰ For *Streptococcus pneumoniae* (and other phosphorylcholine-expressing bacteria, such as nontypeable *Haemophilus influenzae*¹¹ and *Acinetobacter* species¹²), adhesion and infection of lower airway cells is facilitated by an interaction between bacterial phosphorylcholine and the platelet-activating factor receptor (PAFR; 10-alkyl-2-acetyl-glycerophosphocholine PAF) expressed on host cells.¹³ Because previous studies report that inhaled toxins, including fossil fuel-derived particulate matter (PM) and cigarette smoke,^{14,15} through induction of oxidative stress, upregulate PAFR-

From ^athe Blizard Institute, Queen Mary University of London; ^bthe Centre for Inflammation and Tissue Repair, Department of Medicine, Royal Free and University College Medical School, Rayne Institute, London; ^cInserm U955 Equipe 4, Faculté de Médecine, Créteil; ^dthe Health Effects Laboratory Division, National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown; ^ethe Welding Institute, Cambridge; ^fthe MRC Lifecourse Epidemiology Unit, University of Southampton; and ^gthe MRC-PHE Centre for Environment and Health, Analytical & Environmental Sciences Division, Faculty of Life Sciences & Medicine, King's College London. Supported by Colt Foundation grant number CF/05/12. R.J.J. is supported by Wellcome Trust grant 097216/Z/11/Z, and J.P. is supported by Medical Research Council grant MR/K00168X/1.

Disclosure of potential conflict of interest: G. Melton is exclusively funded by the Welding Institute (an independent research organization, limited by guarantee), which is funded by member subscriptions (about 800 members worldwide), single-client and joint industry projects, and European Union- and United Kingdom-funded projects. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication February 11, 2015; revised May 29, 2015; accepted for publication June 29, 2015.

Corresponding author: Jonathan Grigg, MD, Blizard Institute, London E1 2AT, United Kingdom, E-mail: j.grigg@qmul.ac.uk.

0091-6749/\$36.00

© 2015 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.06.033>

Abbreviations used

BALF:	Bronchoalveolar lavage fluid
CFU:	Colony-forming units
IPD:	Invasive pneumococcal disease
LDH:	Lactate dehydrogenase
MS-WF:	Mild steel welding fumes
NAC:	N-acetylcysteine
OP:	Oxidative potential
PAFR:	Platelet-activating factor receptor
PM:	Particulate matter
StS-WF:	Stainless steel welding fumes
UK:	United Kingdom
WF:	Welding fumes

dependent adhesion of pneumococci to airway epithelial cells, we hypothesized that hypersusceptibility to pneumonia in welders is mediated through PAFR-dependent pneumococcal adhesion. Therefore in this study we sought to assess the oxidative potential (OP) of mild steel welding fumes (MS-WF), the effect of MS-WF on PAFR-dependent pneumococcal adhesion and infection in human lower airway cells *in vitro*, and PAFR-dependent pneumococcal airway infection in a mouse model. We also assessed PAFR in stored lung tissue from a study in which mice were exposed to aerosolized stainless steel welding fumes (StS-WF) and from a study of particles in welders' lungs.¹⁶

METHODS**WF: Generation and composition**

MS-WF were a gift from the Welding Institute (Cambridge, UK). MS-WF were obtained by using a standardized method in accordance with the International Standard 15011-1:2009, as previously described.¹⁷ Briefly, manual metal arc welding electrodes (mild steel E7018 basic type) were run to produce a weld bead inside a fume collection system. MS-WF with a mode particle diameter of 6.8 μm ¹⁸ were extracted through the hood on top of the box, collected on a filter paper, removed by brushing, and stored in airtight glass containers. The composition of MS-WF was determined after digestion in nitric/hydrochloric acid in a high-temperature, closed-vessel, microwave-assisted dissolution system. Analysis was done by using inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy. Before use, MS-WF were suspended in PBS.

WF: OP

The OP of MS-WF was determined based on their ability to oxidize antioxidants from a validated *in vitro* respiratory tract lining fluid model containing equimolar (200 $\mu\text{mol/L}$) and physiologically relevant concentrations of ascorbate, urate, and glutathione.¹⁹ Incubations were performed with particle suspensions at a final concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ for 4 hours at 37°C (pH 7.4) in parallel to particle-free and PM controls (an oxidatively inert carbon black [M120] and an oxidatively active urban PM [NIST1648a]). At the end of this period, particles were removed by means of centrifugation (13,000 rpm at 48°C), and samples were acidified with metaphosphoric acid (final concentration 5%) before determination of the remaining antioxidant concentrations by using reverse-phase HPLC with electrochemical detection (for ascorbate) and the glutathione disulphide-reductase-5, 59-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) recycling assay (for glutathione).¹⁹ OP was determined based on

the percentage loss of ascorbate and glutathione over the 4-hour incubation period relative to a 4-hour particle-free control (reflecting back-ground auto-oxidation rates). Under these conditions, urate losses are not significant.^{16,17} The percentage loss of ascorbate and glutathione over the 4-hour incubation was then normalized to the particle concentration used in the respiratory tract lining fluid assay (50 $\mu\text{g/mL}$) to generate 2 separate measures of OP: glutathione-dependent OP (OP_{glutathione}) per microgram and ascorbate-dependent OP (OP_{ascorbate}) per microgram. In addition, an aggregate sum of the 2 measures was calculated (OP_{total} per microgram),²⁰ previous work having shown that ascorbate and glutathione oxidation is sensitive to different panels of oxidants.^{16,17}

Pneumococcal adhesion and infection: Human airway cells

A549 cells, a type II pneumocyte cell line (Sigma-Aldrich, Poole, UK), were maintained in Dulbecco modified Eagle medium supplemented with FBS, L-glutamine, and antibiotics (Lonza, Basel, Switzerland). Passage number was less than 20. BEAS-2B, a bronchial epithelial cell line, was a gift from Dr Nicolas Mercardo (National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London, UK). BEAS-2B cells were maintained in RPMI-1640 medium containing HEPES (Life Technologies, Warrington, UK) supplemented with FBS L-glutamine and antibiotics. Passage number was less than 20.

Cell viability was assessed by using the lactate dehydrogenase (LDH) assay (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. Cells treated with distilled water (indicating 100% LDH release) were used as a positive control. Primary human bronchial epithelial cells (purchased from Promocell, Heidelberg, Germany; lot no. 4032402) were maintained according to the manufacturer's instructions. Passage number was less than 4. The type 2 S pneumoniae encapsulated strain D39 was purchased from the National Collection of Type Cultures (NCTC 7466; Central Public Health Laboratory, London, UK) and grown in liquid culture brain-heart infusion broth (Oxoid, Basingstoke, UK) to the midlogarithmic phase (OD₆₀₀ 5.0-5.6) before use.

Pneumococcal adhesion and infection, and infection alone of airway cells were assessed by using a standard *in vitro* assay.^{14,15} Briefly, airway epithelial cells were cultured with MS-WF for 2 hours, washed, and infected with S pneumoniae at a multiplicity of infection of 100 for 2 hours to assess the combination of pneumococcal adhesion and infection of cells. Cells were then vigorously washed, detached, and lysed with sterile distilled water. Serial dilutions of the samples were plated on brain-heart infusion agar containing 5% horse blood (Oxoid), and colony-forming units (CFU) per milliliter were assessed. In this assay CFU values after cell lysis reflect both pneumococci attached to the surfaces of airway cells (ie, the adherent fraction) and pneumococci that penetrate into cells (ie, the infective fraction). The adherent fraction was first killed with gentamicin (200 mg/mL) and penicillin G (10 mg/mL), to assess the infective fraction alone. Intracellular pneumococci that were protected from antibiotics were recovered by means of cell lysis with ice-cold sterile water, and CFU values were determined.¹⁵ The functional role of PAFR was assessed by adding a specific PAFR blocker, (RS)-2-methoxy-3-(octadecylcarbamoyloxy)-propyl-2-(3-thiazolio) ethylphosphate (CV-3988),²¹ at a final concentration of 20 mmol/L. The role of oxidative stress was assessed by adding the thiol antioxidant N-acetylcysteine (NAC; Sigma-Aldrich)²² at a final concentration of 5 mmol/L at the same time as MS-WF.

Pneumococcal infection: Mouse model

Four- to 6-week-old female CD1 mice (Charles River, Welwyn Garden City, UK) were exposed to MS-WF in 50 µL of PBS (administered either as a single 600 µg dose or as divided doses) through intranasal installation after achievement of isoflurane anesthesia. Twenty-four hours after instillation of MS-WF, animals were intranasally infected with 5 × 10⁶ S pneumoniae strain D39 in 50 µL of PBS. Animals were killed at 24 hours after pneumococcal infection by using a pentobarbital overdose. Pneumococcal CFU values in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung tissue (done after BAL), and blood were assessed by plating serial dilutions on brain-heart infusion agar containing 5% horse blood (Oxoid). Mouse experiments were approved by University College London's Biological Services Ethical Committee under UK Home Office Project License PPL70/6510 and performed according to UK national guidelines for animal use and care under UK Home Office license in accordance with European Union Directive 2010/63/EU. Animals received 30 µL of 5 mg/kg of the PAFR blocker CV-3988 (Sigma-Aldrich) administered by means of tail vein injection 1 hour before pneumococcal infection to assess the effect of blocking PAFR.

PAFR expression: Human airway cells

Expression of PAFR protein by airway cells in vitro was quantified by means of fluorescence microscopy. Briefly, 4 × 10⁵ cells were grown on coverslips in 24-well plates and cultured with MS-WF. Cells were fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature and washed with PBS with 10% FCS (wash buffer). Cells were exposed overnight at 48°C to either a mouse anti-human PAFR IgG2a antibody (1:100, CAY160600; Cayman Chemicals, Ann Arbor, Mich) or a mouse IgG isotype control (Bio-Legend, San Diego, Calif). Cells were washed with wash buffer and an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody applied (1:1000; Invitrogen, Grand Island, NY) at room temperature for 30 minutes under aluminum foil. Cells were washed with wash buffer and 49, 6-Diamidino-2-Phenylindole, Di-lactate (1:1000, Invitrogen) applied at room temperature for 15 minutes under aluminum foil. Finally, cells were washed with wash buffer, and the coverslips were mounted on glass slides and sealed. Slides were left to air dry under foil for 4 hours and stored overnight at 48°C for analysis. Images were taken with an epifluorescence microscope and analyzed by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Md). The isotype control confirmed that interactions between the anti-human PAFR antibody and the secondary antibody detected by using immunofluorescence microscopy were specific. Images were obtained from 3 randomly selected areas of each slide and analyzed blind to exposure status. By using the software, a fluorescence intensity threshold was set to discount background nonspecific fluorescence. The area of specific fluorescence was then measured for each image, with 1 to 3 images analyzed in each experiment and expressed as square micrometers.

PAFR mRNA expression: Mouse model

Expression of mouse lung PAFR mRNA was assessed by means of quantitative PCR. Briefly, lungs were removed and stored in RNAlater (Qiagen, Manchester, UK) at 2808°C. RNA was extracted with the RNeasy Kit (Qiagen). First-strand cDNA synthesis was carried out with SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies). Real-time PCR was carried out with TaqMan Gene Expression MasterMix (Life Technologies).

TABLE I. Composition of MS-WF

	Total weight of sample (%)
Aluminum	0.3
Barium	<0.1
Bismuth	<0.1
Calcium	8.9
Cobalt	<0.1
Chromium	<0.1
Copper	<0.1
Iron	12.4
Potassium	23.6
Lithium	0.4
Magnesium	5.3
Manganese	3.8
Molybdenum	<0.1
Sodium	2.6
Nickel	<0.1
Lead	<0.1
Silicon	2.1
Titanium	0.6
Vanadium	<0.1
Zinc	0.2
Fluoride ions	17.9
Chromium (VI)	<0.1

Each element is represented as a percentage of the total weight of the sample provided. The composition of MS-WF was determined by using inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy.

mRNA analysis was carried out according to the manufacturer's instructions by using relative quantification involving normalization to a reference gene. Primer/probe sets used were as follows: mouse reference gene b2-microglobulin, Mm00437762_m1; mouse PAFR, Mm02621061_m1 (Life Technologies). All primer/probe sets spanned exon-exon boundaries to control for genomic DNA contamination.

PAFR: Stored samples

The effect of aerosolized WF on mouse lung PAFR mRNA expression was assessed by using tissue samples from mice exposed to aerosolized StS-WF. Mouse lung tissue was obtained from 6-week-old C57BL/6J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me) exposed by means of whole-body inhalation to 40 mg/m³ StS-WF for 3 hours per day for up to 10 days. Lung PAFR mRNA expression was compared between air-exposed and StS-WF-exposed controls at both 4 hours and 28 days after the last dose. The design and construction of the aerosol generator and the characterization of StS-WF have been previously described.²³ Full details are provided in the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org.

The distribution of airway PAFR in a nonsmoking welder and a nonsmoking non-WF-exposed control subject was assessed by immunostaining samples from a study in which normal tissue was obtained at the time of a clinical biopsy for suspected cancer.¹⁶ Full details are provided in the Methods section in this article's Online Repository. Previous sampling and present analysis of human lung tissue was approved by an institutional review board for human studies.¹⁶

Statistical analysis

Statistical analysis was done with GraphPad Prism software (version 5.03; GraphPad Software, La Jolla, Calif). Data were obtained from at least 3 separate experiments performed at

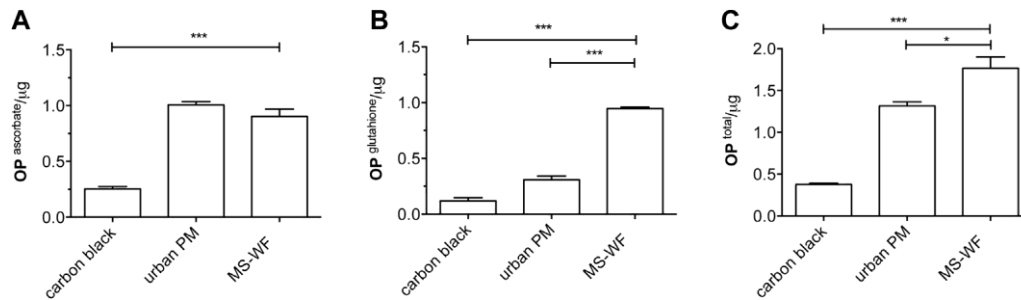


FIG 1. The OP of MS-WF assessed based on their *in vitro* capacity to deplete antioxidants over 4 hours. Par- particle standards included in the assay are as follows: (1) low-OP carbon black (M120) and (2) high-OP urban air PM (NIST1648a). The OP of MS-WF (OP per microgram of PM) is given for ascorbate (A), glutathione (B), and total values (C). Data are from 3 experiments and presented as means (SEMs). Comparisons are performed by using 1-way ANOVA with the Tukey post hoc multiple comparison test. * $P < .05$ and *** $P < .001$.

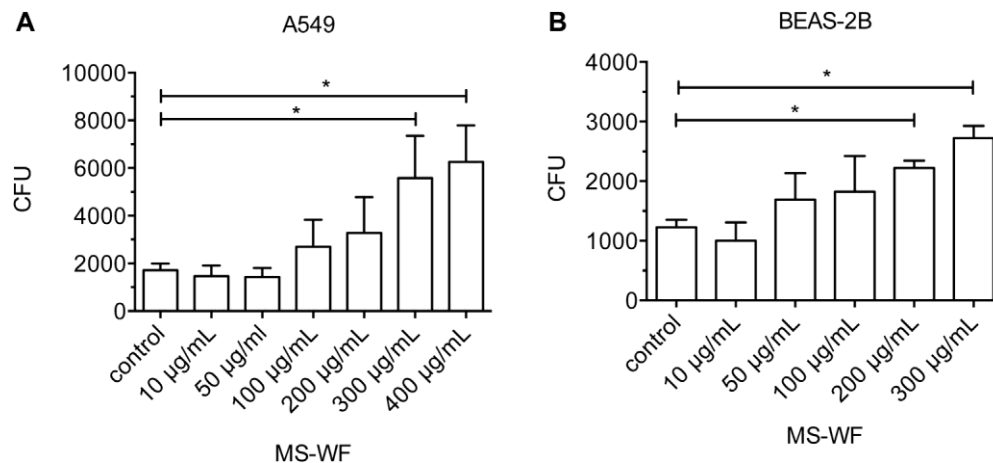


FIG 2. Effect of 2 hours of exposure of human airway cells *in vitro* to MS-WF on pneumococcal adhesion and infection. Cells were infected with *S pneumoniae* for 2 hours at a multiplicity of infection of 100. A, A549 cells. B, BEAS-2B cells. Increased pneumococcal adhesion and infection are reflected by increased CFU values determined by means of quantitative bacterial culture. Data are from 3 to 4 separate experiments, each with 3 technical replicates, and presented as means (SEMs). Data are compared by using 1-way ANOVA and the Tukey post hoc multiple comparison test. * $P < .05$.

different times, with each data point representing the mean of at least 3 replicates, unless otherwise stated. Data from *in vitro* airway epithelial experiments were analyzed by using either the *t* test or 1-way ANOVA and the Tukey multiple comparison test and are summarized as means (SEMs). Data from animal experiments are summarized by medians and analyzed either by using the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparison test. A *P* value of less than .05 was considered significant.

RESULTS

WF: OP

MS-WF contained iron, manganese, titanium, aluminum, and zinc (Table I). The OP of MW-WF for ascorbate and glutathione was increased compared with that of carbon black, and the total OP of MS-WF was increased compared with that of urban PM (Fig 1).

Pneumococcal adhesion and infection: Human airway cells

We first performed dose-response experiments with A549 and BEAS-2B cells to determine the optimal concentration of MS-WF that stimulated adhesion without causing cytotoxicity. MS-WF at concentrations between 200 and 400 μg/mL for 2 hours increased pneumococcal adhesion and infection of both airway

cell lines (Fig 2) without causing cytotoxicity, as assessed based on LDH release (see Fig E1 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). A lower concentration of MS-WF (10 μg/mL) stimulated pneumococcal adhesion and infection, but this required extending culture duration to 24 hours (see Fig E2 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Thus we chose to expose cells to MS-WF for 2 hours at 275 μg/mL (145 μg/cm²) for A549 cells and 200 μg/mL (105 μg/cm²) for BEAS-2B cells. By adding antibiotics to kill the fraction of pneumococci adherent to cell surfaces, it was determined that MS-WF for 2 hours also increased the infective fraction of pneumococci (Fig 3). MS-WF did not directly stimulate pneumococcal growth (data not shown).

Pneumococcal infection: Mouse model

Intranasal instillation of a single 600-μg dose of MS-WF in mice 24 hours before pneumococcal infection resulted in an increase in BALF and lung pneumococcal CFU values at 24 hours after pneumococcal infection (Fig 4). BALF and lung pneumococcal CFU values were also increased when MS-WF was administered as 6 separate 100-μg doses once a day for 6 days (total, 600 μg), followed by infection 24 hours after the last dose (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). In this model pneumococci were not isolated from the blood.

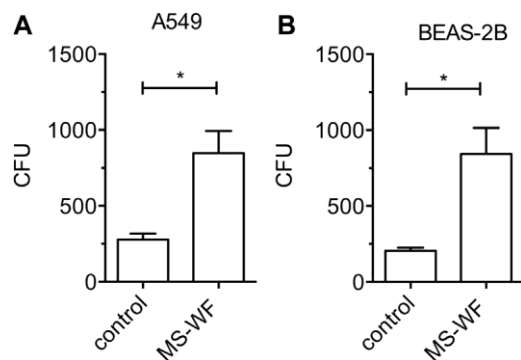


FIG 3. Effect of exposure of human airway cells in vitro to MS-WF for 2 hours on the infective fraction of *S pneumoniae*. Cells were infected with *S pneumoniae* for 2 hours at a multiplicity of infection of 100. Pneumococci that were adherent to cell surfaces were first killed by antibiotics to assess the infective fraction. Intracellular bacteria that were protected from antibiotics were then recovered by means of cell lysis, and CFU values were assessed by means of quantitative culture. **A**, A549 cells cultured with 275 $\mu\text{g/mL}$ ($145 \mu\text{g/cm}^2$). **B**, BEAS-2B cells cultured with 200 $\mu\text{g/mL}$ ($105 \mu\text{g/cm}^2$). Data are from 3 separate experiments, with 3 technical replicates per experiment, and presented as means (SEMs). Data are compared by using t tests. * $P < .05$.

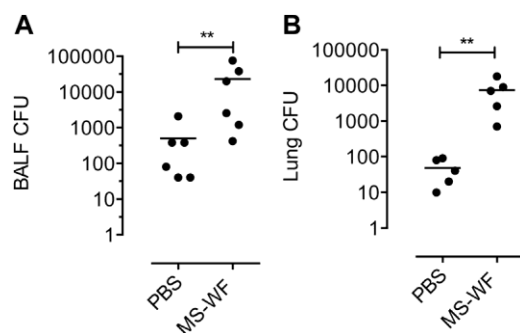


FIG 4. Effect of exposure of mice to a single 600 μg intranasal dose of MS-WF on *S pneumoniae* CFU values. Mice were infected 24 hours after instillation of MS-WF, and CFU values were assessed by means of qualitative culture 24 hours after infection. **A**, BALF CFU values. **B**, Lung tissue CFU values. Dot plots are group and compared by using the Mann-Whitney U test. Bars represent medians. ** $P < .01$.

PAFR-dependent adhesion and infection: Human airway cells

A549 and BEAS-2B cell culture with MS-WF for 2 hours increased PAFR protein expression (Fig 5). The addition of CV-3988 to MS-WF-exposed cells reduced pneumococcal adhesion and infection of A549 and BEAS-2B cells and of human primary bronchial epithelial cells (Fig 6). Adding NAC at the same time as MS-WF attenuated pneumococcal adhesion and infection of A549 and BEAS-2B cells (Fig 7).

PAFR-dependent infection: Mouse model

A single intranasal dose of 600 μg of MS-WF increased lung PAFR mRNA expression at 24 hours (Fig 8). Pretreatment of MS-WF-exposed mice with CV-3988 1 hour before infection attenuated BALF CFU values. Pretreatment of MS-WF-exposed mice with CV-3988 did not reduce lung CFU values (Fig 9). In PBS-treated animals CV-3988 had no effect on either BALF or lung CFU values (data not shown).

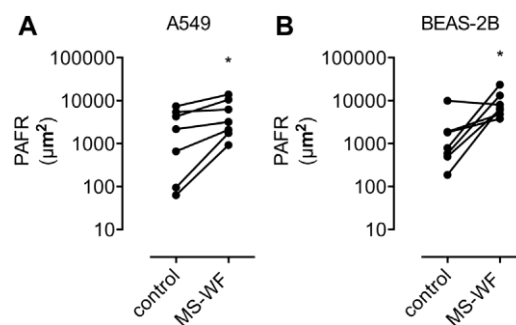


FIG 5. Effect of exposure of MS-WF on PAFR protein expression by human airway cells. Images were taken by using an epifluorescence microscope and analyzed with ImageJ software. A fluorescence intensity threshold was set to discount background fluorescence. The area of fluorescence (in square micrometers) was then measured for each image. **A**, A549 cells cultured with MS-WF (275 $\mu\text{g/mL}$) for 2 hours. **B**, BEAS-2B cells cultured with MS-WF (200 $\mu\text{g/mL}$) for 2 hours. Data are from 3 to 4 separate experiments, with 3 replicates per experiment. Control PAFR expression in separate experiments is highly variable, and data are therefore compared by using paired t tests. * $P < .05$ versus control subjects.

PAFR: Stored samples

A 10-day course of 40 mg/m^3 of aerosolized StS-WF for 3 hours per day increased mouse lung PAFR mRNA expression compared with that seen in air-exposed control subjects at both 4 hours and 28 days after the last dose (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

Lung biopsy tissue was available from a single nonsmoking welder and a single nonsmoking control subject. Specific PAFR immunostaining of bronchial and alveolar epithelial cells was present in the nonsmoking welder. Less intense specific bronchial epithelial PAFR was present in the nonsmoking control subject (see Fig E5 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

DISCUSSION

In this study we sought to identify a mechanism for the hypersusceptibility of welders to bacterial pneumonia reported in epidemiologic studies.^{2,4,24} We focused on *S pneumoniae* because this bacterium is the most common cause of community-acquired pneumonia in adults.¹⁰ In addition, a review of all patients presenting with invasive pneumococcal disease (IPD) in Alberta (Canada) from 2000 to 2004 by Wong et al²⁵ reported a 2.7-fold greater incidence of IPD in welders; of the 18 welders with IPD, 17 had bacteremic pneumococcal pneumonia, 1 had meningitis, and 1 died of pneumococcal infection. Pneumococcal infection in welders remains a problem. For example, in April 2015, the Northern Ireland Health Protection Service investigated an outbreak of IPD in shipyard workers and identified WF exposure as a possible risk factor.²⁶ In the present study we found that intranasal instillation of MS-WF in mice, followed by infection with *S pneumoniae*, resulted in a 50- to 175-fold increase in airway and lung CFU values.

We also found that MS-WF-induced hypersusceptibility to pneumococcal infection is mediated in part by PAFR (a host receptor used by pneumococci to adhere to and infect lower airway cells¹³) because MS-WF increased mouse lung PAFR mRNA expression and that treatment of mice with the PAFR blocker CV-3988 before pneumococcal infection significantly

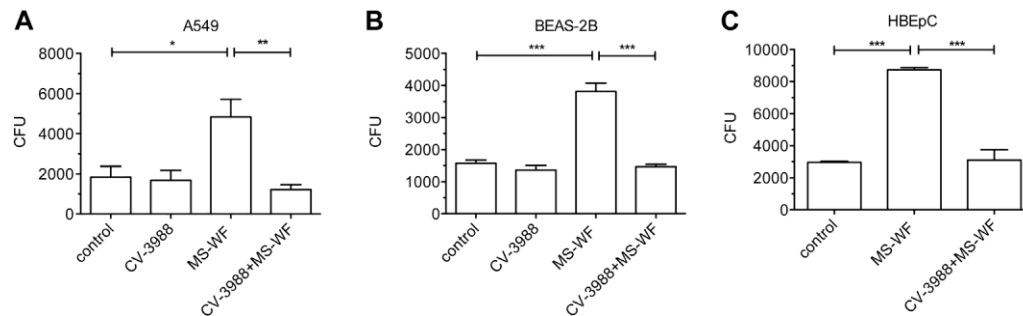


FIG 6. Effect of the PAFR blocker CV-3988 (20 μ mol/L) on *S. pneumoniae* adhesion and infection to A549 cells cultured with MS-WF (275 μ g/mL; **A**), BEAS-2B cells cultured with MS-WF (200 μ g/mL) for 2 hours (**B**), and human primary bronchial epithelial cells cultured with MS-WF (200 μ g/mL) for 2 hours (**C**). Data are from 3 or more separate experiments, with 3 replicates per experiment, and presented as means (SEMs). Data are compared by using 1-way ANOVA and the Tukey multiple comparison test. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$.

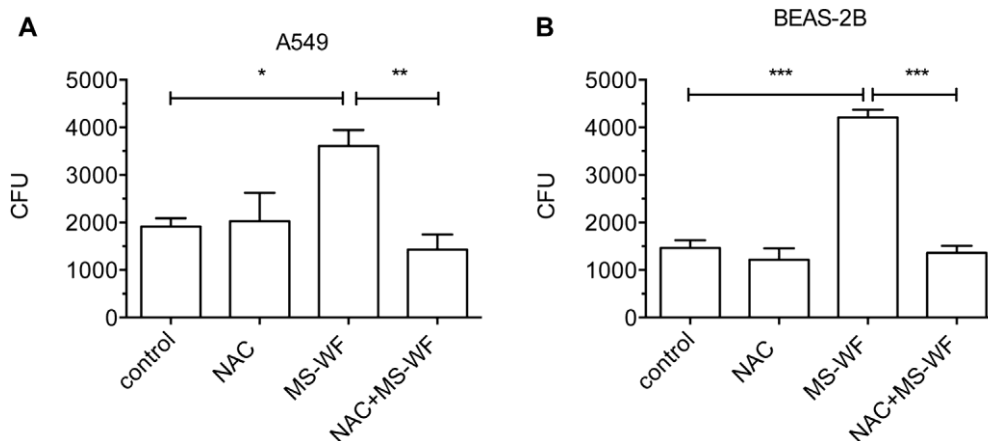


FIG 7. Effect of the antioxidant NAC on adhesion and infection of *S. pneumoniae* to airway cells. NAC was added to cells at the same time as MS-WF. **A**, A549 cells cultured with MS-WF (275 μ g/mL) for 2 hours. **B**, BEAS-2B cells cultured with MS-WF (200 μ g/mL) for 2 hours. Data are from 3 separate experiments, with 3 technical replicates per experiment, and presented as means (SEMs). Data are compared by using 1-way ANOVA and the Tukey post hoc multiple comparison test. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$.

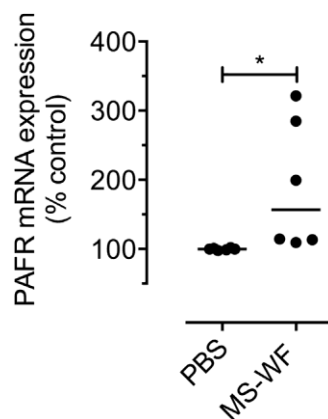


FIG 8. Effect of a single 600 μ g intranasal dose of MS-WF on mouse lung PAFR mRNA expression assessed at 24 hours after instillation. Lung PAFR mRNA expression was assessed by means of real-time PCR with relative quantification by using normalization to the reference gene β 2-microglobulin. Dot plots are from 6 mice per group and compared by using the Mann-Whitney test. The bar represents the median. * $P < .05$.

reduced lower airway bacterial load. Additional evidence for a role of PAFR was provided by *in vitro* experiments. First, MS-WF stimulated PAFR-dependent adhesion and infection of human lower airway cells. Second, CV-3988 attenuated MS-WF-stimulated pneumococcal adhesion and infection of human airway

cell line cells and primary bronchial epithelial cells. Pneumococcal adhesion and infection stimulated by MS-WF is likely to be mediated by cellular oxidative stress because this is blocked by the antioxidant NAC. Indeed, these data are compatible with previous reports of induction of cellular oxidative stress by WF²⁷ and the capacity of NAC to attenuate pneumococcal adhesion and infection stimulated by fossil-fuel PM.¹⁴ Furthermore, increased glutathione peroxidase and total antioxidants in the serum of active welders provides evidence that WF induce oxidative stress *in vivo*.²⁸

To date, the role of PAFR in mediating vulnerability to pneumococcal pneumonia in human subjects is not fully defined.²⁹ However, this role is well established in animal models. For example, reduced PAFR expression by lower airway epithelial cells decreases mortality from pneumococcal infection in mice.³⁰ Conversely, increased airway epithelial PAFR causes hypersusceptibility of mice to pneumococcal infection.³¹ Indirect evidence that airway PAFR is important in human subjects is provided by our previous observation that bronchial epithelial PAFR expression is increased in smokers.¹⁵ In the present study PAFR was more strongly expressed by lower airway epithelial cell counts in the nonsmoking welder compared with the nonsmoking, non-WF-exposed control subject. To determine whether epithelial PAFR expression is increased in welders requires further lung biopsy samples from nonsmoking welders and nonsmoking control subjects, but to date, these have not been obtained.

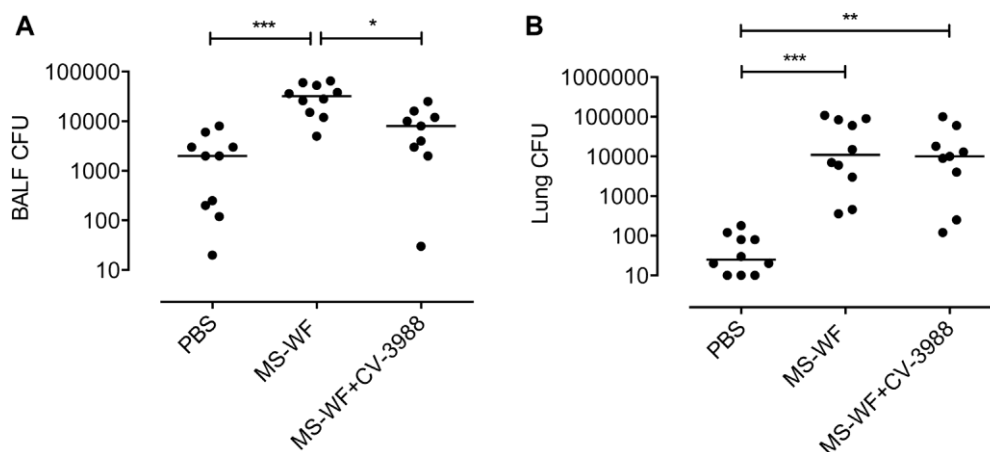


FIG 9. Effect of intravenous treatment of mice with the PAFR blocker CV-3988 (5 mg/kg) administered 1 hour before infection with *S pneumoniae* in animals exposed to a single 600 µg intranasal dose of MS-WF. **A.** BALF pneumococcal CFU values. **B.** Lung pneumococcal CFU values. Data are representative of 2 separate experiments and compared by using the Kruskal-Wallis test and Dunn multiple comparison test. Bars represent medians. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$.

The limitations of this study are as follows. First, it is unclear whether the concentrations of MS-WF used in vitro reflect exposure of airway cells in vivo. However, concentrations of MS-WF used in the adhesion and infection assays are similar to those estimated by Phalen et al³² (85 µg/cm²) for hot spots of inhaled PM deposition on airway cells. Furthermore, we found that lower concentrations of MS-WF (ie, 5 µg/cm²) stimulated pneumococcal adhesion and infection but required prolonged culture duration.

Second, it is unclear whether a single 600 µg intranasal dose of MS-WF in the mouse reflects the dose inhaled by welders. However, there is evidence that welders inhale very high concentrations of PM. For example, Kim et al³³ reported mean daily exposures of welders to inhalable PM of 1660 µg/m³ compared with 40 µg/m³ in nonexposed control subjects.

Third, we did not assess the effect of aerosolized MS-WF, a more physiologic delivery method. However, using stored samples, we found that exposure of mice to aerosolized StS-WF stimulates lung PAFR mRNA expression. Furthermore, our pilot data suggest that StS-WF also stimulates PAFR-dependent pneumococcal adhesion and infection to lower airway cells in vitro (see Fig E6 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Finally, it is unclear why pretreatment of MS-WF-exposed mice with the PAFR blocker CV-3988 attenuates airway (BALF) CFU values but does not attenuate lung tissue CFU values. We speculate that although PAFR-dependent adhesion is important in establishing airway infection, PAFR-independent mechanisms contribute to the development of pneumococcal infection in the lung tissue compartment.

In summary, we found that MS-WF increases PAFR-dependent pneumococcal adhesion and infection of human lower airway cells in vitro and pneumococcal airway infection in mice. This study suggests a mechanism for the increased vulnerability of welders to pneumococcal pneumonia reported in epidemiologic studies. Therefore these data provide biological plausibility for the UK Health and Safety Executive Guideline that the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine "should be considered for people whose work exposes them to frequent or continuous exposure to metal fume (e.g. welders), taking into account the exposure control measures in place."³⁴

We thank Professor David Coggon for his advice in developing this study and Esmie Purdie for performing the oxidative stress experiments.

Key messages

- Exposure of human lower-airway epithelial cells to WF in vitro results in hypersusceptibility to platelet-activating factor-dependant pneumococcal adhesion and infection.
- Exposure of mice to WF results in hypersusceptibility to pneumococcal airway infection.
- The increased risk of pneumococcal pneumonia in welders reported in epidemiologic studies is biologically plausible.

REFERENCES

1. Registrar General. Decennial Supplement England and Wales 1971: Occupational Mortality Tables. London: HMSO; 1971.
2. Palmer KT, Cullinan P, Rice S, Brown T, Coggon D. Mortality from infectious pneumonia in metal workers: a comparison with deaths from asthma in occupations exposed to respiratory sensitizers. *Thorax* 2009;64:983-6.
3. Palmer KT, Poole J, Ayres JG, Mann J, Burge PS, Coggon D. Exposure to metal fume and infectious pneumonia. *Am J Epidemiol* 2003;157:227-33.
4. Toren K, Qvarfordt I, Bergdahl IA, Jarvholm B. Increased mortality from infectious pneumonia after occupational exposure to inorganic dust, metal fumes and chemicals. *Thorax* 2011;66:992-6.
5. Suri R, Mallia P, Martin JE, Footitt J, Zhu J, Trujillo-Torralbo MB, et al. Bronchial platelet-activating factor receptor in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2014;108:898-904.
6. Koh DH, Kim JI, Kim KH, Yoo SW, Korea Welders Cohort Group. Welding fume exposure and chronic obstructive pulmonary disease in welders. *Occup Med (Lond)* 2015;65:72-7.
7. Antonini JM, Roberts JR, Stone S, Chen BT, Schwegler-Berry D, Frazer DG. Short-term inhalation exposure to mild steel welding fume had no effect on lung inflammation and injury but did alter defense responses to bacteria in rats. *Inhal Toxicol* 2009;21:182-92.
8. Antonini JM, Stone S, Roberts JR, Chen B, Schwegler-Berry D, Afshari AA, et al. Effect of short-term stainless steel welding fume inhalation exposure on lung inflammation, injury, and defense responses in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:234-45.
9. Antonini JM, Taylor MD, Millecchia L, Bebout AR, Roberts JR. Suppression in lung defense responses after bacterial infection in rats pretreated with different welding fumes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;200:206-18.
10. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* 2009;374:1543-56.
11. Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg Ii K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, et al. Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of

- lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol* 2000;37:13-27.
12. Smani Y, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, Dominguez-Herrera J, Ibanez-Martinez J, Pachon J. Platelet-activating factor receptor initiates contact of *Acinetobacter baumannii* expressing phosphorylcholine with host cells. *J Biol Chem* 2012;287: 26901-10.
 13. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet- activating factor. *Nature* 1995;377:435-8.
 14. Mushtaq N, Ezzati M, Hall L, Dickson I, Kirwan M, Png KM, et al. Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human airway epithelial cells exposed to urban par- ticulate matter. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1236-42.e2.
 15. Grigg J, Walters H, Sohal SS, Wood-Baker R, Reid DW, Xu CB, et al. Cigarette smoke and platelet-activating factor receptor dependent adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to lower airway cells. *Thorax* 2012;67:908-13.
 16. Andujar P, Simon-Deckers A, Galateau-Salle F, Fayard B, Beaune G, Clin B, et al. Role of metal oxide nanoparticles in histopathological changes observed in the lung of welders. *Part Fibre Toxicol* 2014;11:23.
 17. McNeilly JD, Heal MR, Beverland IJ, Howe A, Gibson MD, Hibbs LR, et al. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:95-107.
 18. Zimmer AT, Baron PA, Biswas P. The influence of operating parameters on number-weighted aerosol size distribution generated from a gas metal arc welding process. *J Aerosol Sci* 2002;33:519-31.
 19. Kelly F, Anderson HR, Armstrong B, Atkinson R, Barratt B, Beevers S, et al. The impact of the congestion charging scheme on air quality in London. Part 2. Analysis of the oxidative potential of particulate matter. *Res Rep Health Eff Inst* 2011; 155:73-144.
 20. Godri KJ, Green DC, Fuller GW, Dall'Osto M, Beddows DC, Kelly FJ, et al. Particulate oxidative burden associated with firework activity. *Environ Sci Technol* 2010;44:8295-301.
 21. Robertson DN, Smith GM. CV3988 inhibits in vivo platelet aggregation induced by PAF-acether and collagen. *Eur J Pharmacol* 1986;123:91-7.
 22. Messier EM, Day BJ, Bahmed K, Kleeberger SR, Tudor RM, Bowler RP, et al. N-acetylcysteine protects murine alveolar type II cells from cigarette smoke injury in a nuclear erythroid 2-related factor-2-independent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;48:559-67.
 23. Antonini JM, Afshari AA, Stone S, Chen B, Schwegler-Berry D, Fletcher WG, et al. Design, construction, and characterization of a novel robotic welding fume generator and inhalation exposure system for laboratory animals. *J Occup Environ Hyg* 2006;3:194-203, quiz D145.
 24. Coggon D, Inskip H, Winter P, Pannett B. Lobar pneumonia: an occupational disease in welders. *Lancet* 1994;344:41-3.
 25. Wong A, Marrie TJ, Garg S, Kellner JD, Tyrrell GJ, Group S. Welders are at increased risk for invasive pneumococcal disease. *Int J Infect Dis* 2010;14:e796-9.
 26. Patterson L, Irvine N, Wilson A, Doherty L, Loughrey A, Jessop L. Outbreak of invasive pneumococcal disease at a Belfast shipyard in men exposed to welding fumes, Northern Ireland, April-May 2015: preliminary report. *Eurosurveillance* 2015;20(21).
 27. Badding MA, Fix NR, Antonini JM, Leonard SS. A comparison of cytotoxicity and oxidative stress from welding fumes generated with a new nickel-, copper-based consumable versus mild and stainless steel-based welding in RAW 264.7 mouse macrophages. *PLoS One* 2014;9:e101310.
 28. Han SG, Kim Y, Kashon ML, Pack DL, Castranova V, Vallyathan V. Correlates of oxidative stress and free-radical activity in serum from asymptomatic shipyard welders. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1541-8.
 29. Iovino F, Brouwer MC, van de Beek D, Molema G, Bijlsma JJ. Signalling or binding: the role of the platelet-activating factor receptor in invasive pneumococcal disease. *Cell Microbiol* 2013;15:870-81.
 30. Duitman J, Schouten M, Groot AP, Borensztajn KS, Daalhuisen JB, Florquin S, et al. CCAAT/enhancer-binding protein delta facilitates bacterial dissemination during pneumococcal pneumonia in a platelet-activating factor receptor- dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:9113-8.
 31. Miller ML, Gao G, Pestina T, Persons D, Tuomanen E. Hypersusceptibility to invasive pneumococcal infection in experimental sickle cell disease involves platelet- activating factor receptor. *J Infect Dis* 2007;195:581-4.
 32. Phalen RF, Oldham MJ, Nel AE. Tracheobronchial particle dose considerations for in vitro toxicology studies. *Toxicol Sci* 2006;92:126-32.
 33. Kim JY, Chen JC, Boyce PD, Christiani DC. Exposure to welding fumes is associated with acute systemic inflammatory responses. *Occup Environ Med* 2005;62:157-63.
 34. Health and Safety Executive (HSE). Pneumonia vaccination for employees exposed to welding and metal fume. 2014. Available at: <http://www.hse.gov.uk/pubns/eis44.pdf>, 2014. Accessed May 29, 2015.

METHODS

PAFR expression: Stored mouse lung tissue

Mice inhaled StS-WF composed of (weight percentage) iron (57%), chromium (20%), manganese (13%), nickel (8%), and copper (0.2%) with trace amounts of silicon, aluminum, and vanadium. The particle diameters ranged from ultrafine (0.01-0.1 μ m) to coarse (1.0-10 μ m), with the majority of particles in the fine size range (0.1-1.0 μ m). The mass median aerodynamic diameter was 0.255 μ m, with a geometric SD of 1.35. RNA from mice exposed to aerosolized StS-WF was isolated from whole-lung homogenates by using TRIzol (Invitrogen) and then cleaned according to the manufacturer's instructions with an RNeasy Mini Kit (Qiagen). A 2 mL aliquot of each RNA sample was quantified by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del). Briefly, RT-qPCR reactions were carried out by using StepOne (Applied Biosystems, Foster City, Calif) with predesigned Assays-on-Demand TaqMan probes and primers (Applied Biosystems). By using 96-well plates, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed with random hexamers (Applied Biosystems) and Superscript III (Invitrogen). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase was used as the reference gene. Relative gene expression was calculated by using the comparative cycle threshold (DDCT) method. All procedures and protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of the National Institute for Occupational Safety and Health.

PAFR expression: Stored human lung tissue

PAFR antigen retrieval in human lung biopsy tissue was carried out on 3- μ m paraffin wax-embedded sections dried down overnight at 60°C. Slides were placed in an EDTA buffer of pH 8.1 and microwaved at full power for 35 minutes. Slides were then transferred to a DAKO autostainer (DAKO, Glostrup, Denmark), where they were treated with a 3% peroxidase block followed by using the R.T.U Vectastain Kit (PK-7200; Vector Laboratories, Burlingame, Calif), according to the manufacturer's recommendations. The working dilution of the human anti-PAFR mAb CAY160600 (Cayman Chemical) was used at 1:100, and the incubation time was 40 minutes. The signal was visualized by using DAKO DAB1 Chromogen Solution (K3468) applied for 5 minutes. A Gills hematoxylin nuclei counterstain was used for 2 minutes. A negative control using tonsil tissue without the anti-PAFR antibody showed no nonspecific diaminobenzidine signal.

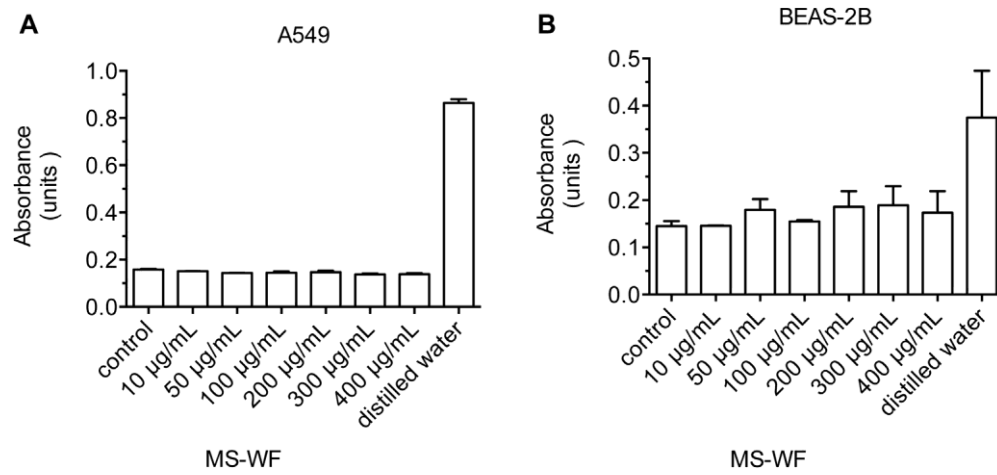


FIG E1. LDH release from A549 cells exposed to 2 hours of MS-WF (**A**) and BEAS-2B cells exposed to 2 hours of MS-WF (**B**). Data are from a single experiment, with 3 technical replicates. The positive control is assessed after total cell lysis by using distilled water. MS-WF at concentrations of 400 µg/mL or less do not cause cytotoxicity in this assay.

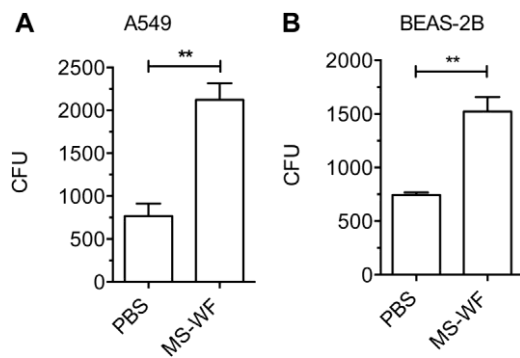


FIG E2. Effect of exposure of airway cells to 10 $\mu\text{g/mL}$ (5 $\mu\text{g/cm}^2$) MS-WF in vitro for 24 hours on the adhesion of *S pneumoniae* to A549 cells (**A**) and BEAS-2B cells (**B**). Increased CFU values determined by using quantitative culture reflect increased pneumococcal adherence. Data are from 3 separate experiments, described as means (SEMs), and compared by using the t test. **P < .01 versus medium control.

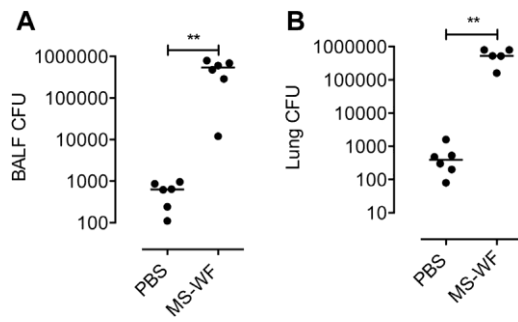


FIG E3. Effect of exposure of mice to 600 µg of intranasal MS-WF administered as 100-µg doses once a day for 6 days on *S pneumoniae* CFU values in BALF (A) and lung tissue (B). Mice were infected 24 hours af- ter instillation of the last dose of MS-WF, and CFU values were assessed by means of qualitative culture. Data are from 6 animals per group and compared by using the Mann-Whitney U test. Bars represent medians. **P < .01.

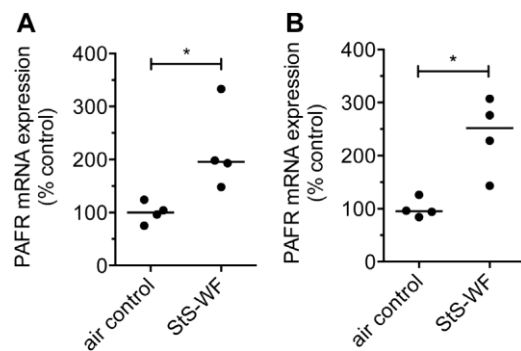


FIG E4. Effect of aerosolized StS-WF on mouse lung PAFR mRNA expression. PAFR mRNA expression was assessed by using real-time quantitative PCR with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as the reference gene. Relative gene expression was calculated by using the DD cycle threshold method. **A**, Four hours after a 10-day course of aerosolized StS- WF (40 mg/m³) for 3 hours. **B**, Twenty-eight days after a 10-day course of 3 hours per day of aerosolized StS-WF (40 mg/m³). Dot plots are from 4 mice per group. Data are compared by using the Mann-Whitney test. Bars represent medians. *P < .05.

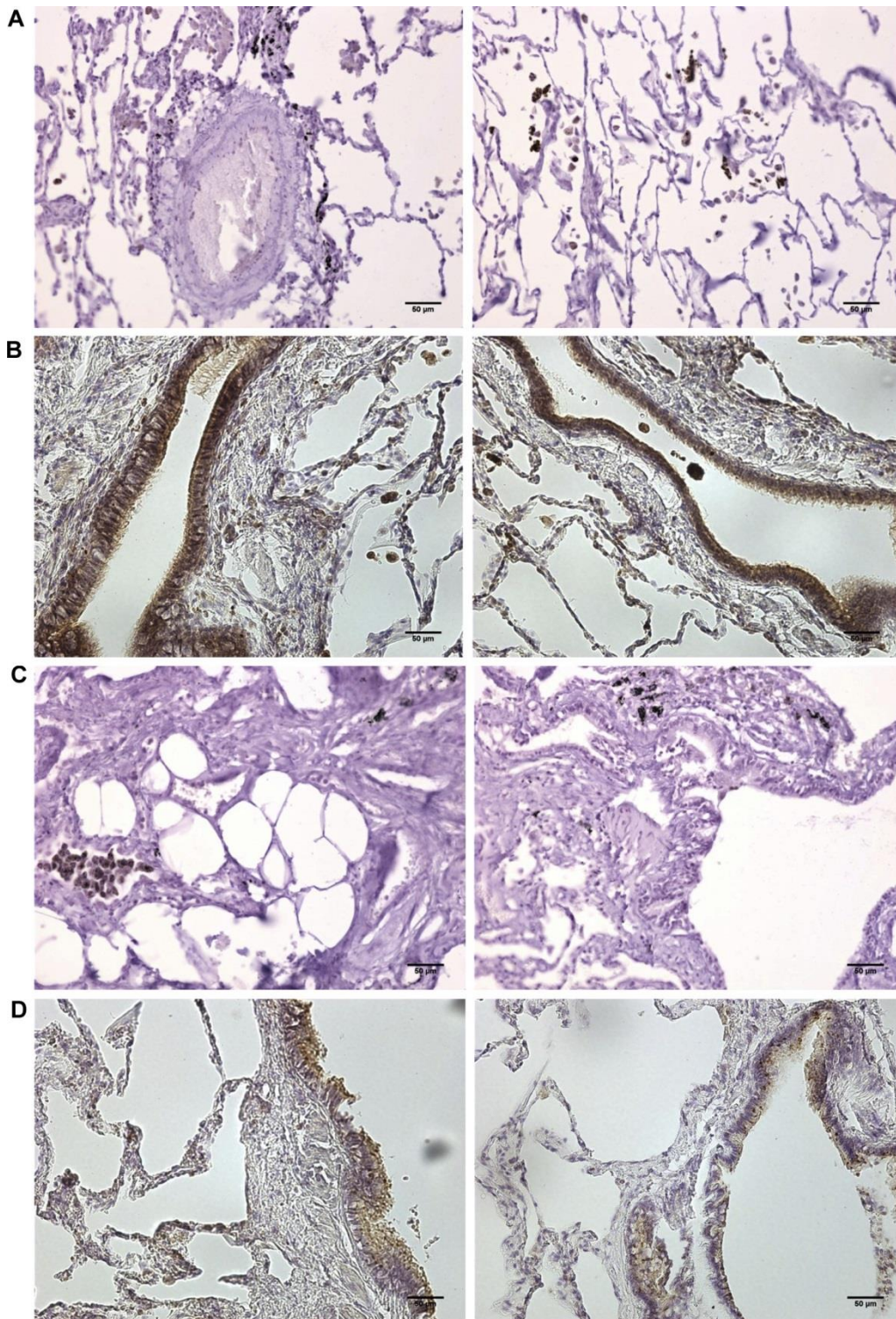


FIG E5. PAFR immunostaining in the human lung. A biopsy specimen of normal tissue was obtained at the time of biopsy for malignancy. **A.** Lung tissue from a nonsmoking welder stained with an isotypic control mAb. There is no specific (brown) staining of epithelial cells. **B.** Lung tissue from a nonsmoking welder stained with a PAFR mAb. There is marked specific staining of bronchial epithelial cells and some specific staining of alveolar epithelial cells. **C.** Lung tissue from a nonsmoking, non-WF-exposed control subject stained with an isotypic control mAb. **D.** Lung tissue from a nonsmoking, non-WF-exposed control subject stained with a PAFR mAb. There is specific PAFR staining of bronchial epithelial cells (brown).

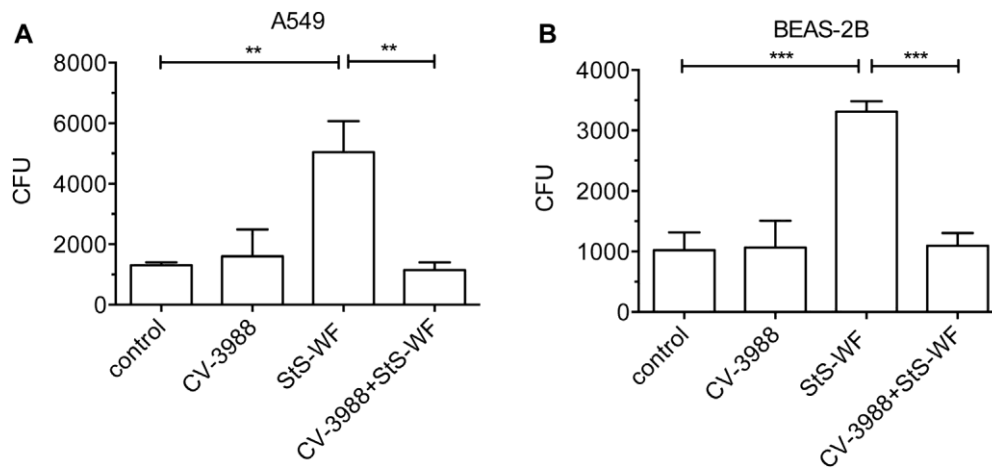


FIG E6. Effect of the PAFR blocker CV-3988 (20 μ mol/L) on adhesion of *S. pneumoniae* to airway cells after 2 hours of exposure to StS-WF. StS-WF (chromium, 4.1%; iron, 3.9%; manganese, 2.7%; and titanium, 1.5%) were generated as described in the Methods section by using E308L manual metal arc welding electrodes. Increased CFU values determined by using quantitative culture reflect increased pneumococcal adhesion and infection. **A**, A549 cells plus 275 μ g/mL StS-WF. **B**, BEAS-2B cells plus 200 μ g/mL StS-WF. StS-WF stimulates pneumococcal adhesion, and this is attenuated by CV-3988. Data are from 4 separate experiments, with 3 replicates per experiment. Data are described as means (SEMs) and compared by using 1-way ANOVA and the Tukey multiple comparison test. * $P < .05$, ** $P < .01$, and *** $P < .001$.

Résumé

Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées : effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie

L'exposition à des nanoparticules manufacturées (NP) peut entraîner des effets sur la santé, notamment au niveau respiratoire, où elles peuvent induire des phénomènes de remodelage pulmonaire. Toutefois, les mécanismes cellulaires sous-jacents à ces effets et l'influence des caractéristiques physico-chimiques des NP dans ces effets sont encore loin d'être compris. L'objectif de cette thèse était d'évaluer la réponse macrophagique à des NP présentant différentes caractéristiques physico-chimiques (taille/longueur, composition chimique, forme, structure cristalline ou propriétés de surface) en se concentrant particulièrement sur leurs effets sur l'autophagie. Nous avons montré que l'exposition de macrophages murins à des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNT) induisait un blocage de l'autophagie tandis que l'exposition à des NP sphériques induisait une autophagie fonctionnelle. Le blocage du flux autophagique par les MWCNT est associé à une accumulation de lysosomes non fonctionnels. Par ailleurs, les MWCNT induisaient une réponse oxydante et pro-inflammatoire plus importante que les particules sphériques qui pourrait être lié à leur blocage de l'autophagie. Ces résultats montrent un rôle prépondérant de la forme des nanomatériaux sur le processus autophagique, et ouvrent de nouvelles voies pour l'interprétation et la compréhension de la toxicité des nanomatériaux.

Mots-clés : nanoparticules manufacturées, caractéristiques physico-chimiques, autophagie, lysosomes

Abstract

Macrophage response to manufactured nanoparticles: effects of their physicochemical characteristics on the autophagy process

Exposure to manufactured nanoparticle (NP) could induce harmful health effects, particularly on the respiratory level, where it could induce lung remodeling effects. However, the exact underlying mechanisms of NP toxicity remain to be elucidated. The aim of this PhD project was to evaluate the responses of macrophages to different NP (varying in size/length, chemical composition, shape, crystal phase or surface properties), focusing on the autophagy process. We have shown that macrophage exposure to multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) induced a blockage of the autophagy flux while spherical nanomaterials induce a functional autophagy. The MWCNT-induced autophagy blockage was associated with a lysosomal impairment. Moreover, MWCNT induced higher oxidative and inflammatory responses than the spherical ones which could be related to their blockage of autophagy. These results suggest a role of the shape of nanomaterials on the autophagy process. These findings could open new ways in the interpretation and understanding of nanomaterials toxicity.

Keywords: manufactured nanoparticles, physicochemical characteristics, autophagy, lysosomes